

Struktur-Funktionsanalyse des Immediate-Early Proteins 2 (IE2) des humanen Zytomegalievirus

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Jasmin Asmar
geboren am 2. Dezember 1972 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Detlev H. Krüger
 2. Prof. Dr. Christian Hagemeyer
 3. PD Dr. Martin Messerle

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2004

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	3
1	<i>Das humane Zytomegalievirus (HCMV)</i>	3
1.1	Taxonomie	3
1.2	Genom	3
1.3	Morphologie	3
1.4	Klinische Aspekte	4
1.5	Latenz und Reaktivierung	5
1.6	Der lytische Infektionszyklus	6
1.7	Einflüsse auf die Wirtszelle - der Zellzyklus	9
1.8	Die <i>major immediate early</i> (MIE)-Genregion	11
1.9	Das IE2-Protein	16
1.10	Struktur-Funktionsanalysen des IE2-Proteins	20
2	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	24
II.	Material und Methoden	25
1	<i>Allgemeine Materialien</i>	25
2	<i>Bakterienkultur und Plasmidisolierung</i>	26
3	<i>Klonierung der IE2-Mutanten</i>	28
4	<i>Ligation, Transformation und DNA-Minipräparation</i>	30
5	<i>Gerichtete in vitro Mutagenese nach der Kunkel-Methode</i>	31
6	<i>DNA-Sequenzierung</i>	34
7	<i>Zellkultur</i>	35
8	<i>Transfektionen</i>	36
9	<i>Zellernte für die Durchflußzytometrie</i>	36
10	<i>Zellextraktion zur Immunoblot-Analyse</i>	38
11	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	38
12	<i>Immunoblot-Analysen</i>	39
13	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	40
14	<i>CAT-Elisa</i>	40
15	<i>Luciferase-Assay</i>	41
16	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i>	42
III.	Ergebnisse	45
1	<i>Experimentelles System - Aktivitäten des Wildtyp IE2-Proteins</i>	45

2	<i>Struktur-Funktionsanalyse des IE2-Proteins</i>	48
3	<i>Die IE2-DNA-Bindung</i>	60
3.1	Etablierung eines DNA Bindungsassays für das HCMV IE2-Protein	61
3.2	Die DNA-Bindung C-terminaler IE2-Mutanten	76
3.3	Die DNA-Bindung interner Deletionsmutanten	78
3.4	Die postulierte Zinkfingerdomäne	80
IV.	Diskussion	83
1	<i>Die IE2-DNA-Bindung</i>	84
2	<i>IE2-Struktur-Funktionsanalyse</i>	87
2.1	Der C-Terminus	87
2.2	N-terminale Sequenzen	89
2.3	Die postulierte Zinkfingerdomäne	92
3	<i>Aufbau und Lokalisation der regulatorischen Domänen des IE2-Proteins</i>	94
V.	Zusammenfassung	98
VI.	Literatur	100
VII.	Anhang	116
	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	116
	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	118
	<i>Veröffentlichungen</i>	120
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	121
	<i>Danksagung</i>	122

I. Einleitung

1 *Das humane Zytomegalievirus (HCMV)*

1.1 Taxonomie

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der *Herpesviridae* und wird innerhalb dieser der Unterfamilie der *Beta-Herpesvirinae* zugeordnet. Die Beta-Herpesviren zeichnen sich durch eine ausgeprägte Speziespezifität, einen relativ langen Replikationszyklus und eine ausgesprochen langsame Vermehrung in der Zellkultur sowie einen charakteristischen zytopathischen Effekt aus. HCMV-infizierte Zellen zeigen ein auffälliges Größenwachstum, welches namensgebend für das Virus wirkte.

1.2 Genom

Herpesviren besitzen ein Genom aus linearer doppelsträngiger DNA, wobei das des humanen Zytomegalievirus mit 235 kbp das größte aller bekannten Viren ist. Für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten HCMV Stamm AD169 wurde das Genom vollständig sequenziert (Chee et al., 1990) und bisher wurden mehr als 150 offene Leseraster (ORFs) identifiziert (Davison et al., 2003; Murphy et al., 2003; Murphy et al., 2003).

Bei allen Herpesviren findet man innerhalb des Genoms einmalig vorkommende (unique) und wiederholte (repeat) Sequenzabschnitte, die bei den Vertretern der jeweiligen Genera in unterschiedlichen Mustern angeordnet sind. Das Genom des Zytomegalievirus besteht aus einem langen (unique long – U_L) und einem kurzen (unique short – U_S) nicht-repetitiven Sequenzabschnitt, welche jeweils von invertierten Einheiten repetitiver Sequenzen flankiert werden (siehe auch Abb. 2). Die offenen Leseraster werden entsprechend ihrer Lokalisation innerhalb des langen oder kurzen nicht-repetitiven Sequenzabschnitts mit U_L und U_S bezeichnet (Roizman, 1993).

1.3 Morphologie

Das humane Zytomegalievirus besitzt eine für Herpesviren typische Morphologie. Das Virion besteht aus einem DNA-haltigen Kern in einem ikosaedrischen Capsid. Dieses Nukleokapsid ist umhüllt von einer Proteinmatrix, dem Tegument (Gibson, 1996; McGavran und Smith, 1965; Wright et al., 1964). Charakteristisch für die Herpesviren ist eine lipidhaltige äußere Hülle (envelope), in die verschiedene viral kodierte Glykoproteine eingelagert sind (Britt und Mach, 1996; Spaete et al., 1994).

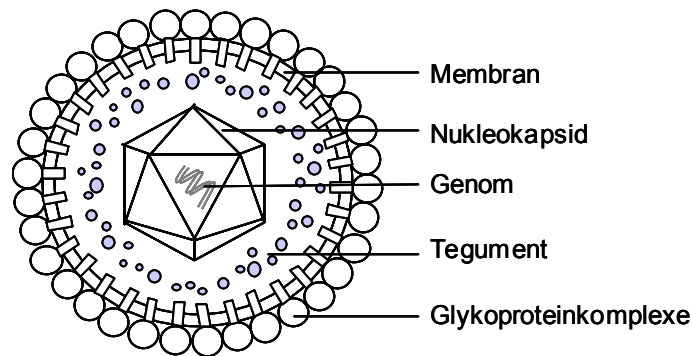


Abb. 1: Schematische Darstellung des humanen Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus gehört zu den von einer Membran umhüllten DNA-Viren. Seine lineare doppelsträngige DNA ist in einem ikosaedrischen Capsid enthalten, welches von einer amorphen Proteinhülle, dem Tegument, umgeben ist. Nach außen schließt sich die Membran an, in die zahlreiche Glykoproteinkomplexe eingelagert sind.

1.4 Klinische Aspekte

Das humane Zytomegalievirus ist ein ubiquitär vorkommendes Virus mit einer Durchseuchungsrate von etwa 80%, wobei die Infektion meist schon während der Kindheit erfolgt (Pass, 2001). Die primäre Infektion verläuft bei den meisten immunkompetenten Erwachsenen mild bis asymptomatisch und geht in ein lebenslang persistierendes Stadium der latenten Infektion über. In Einzelfällen kommt es zur Ausbildung eines mononukleose-ähnlichen Syndroms mit Fieber, Lymphknotenschwellungen, Gastritis oder grippeähnlichen Erscheinungen.

Im Gegensatz dazu kann die Primärinfektion aber auch die Reaktivierung bei einem defizienten Immunsystem, wie bei dem sich entwickelnden Foetus, Transplantations- oder AIDS-Patienten, zu schweren Erkrankungen führen (Pass, 2001).

Die intrauterine Infektion, meist als Folge einer primären Infektion der Mutter, ist die häufigste kongenitale virale Infektion (Pass, 2001) und betrifft 0,7-4,1 % aller Lebendgeburten (Pass, 1999). Hier kann es zu Thrombozytopenie, Hepatosplenomegalie, Hörschäden und Entwicklungsdefekten aufgrund der Infektion des zentralen Nervensystems kommen. So tragen 10-15 % der infizierten Neugeborenen bleibende neurologische Schäden davon (Fowler und Pass, 1995; Fowler et al., 1992; Stagno et al., 1982).

In immunsupprimierten Patienten, wie AIDS- oder Transplantationspatienten, kann eine Primärinfektion aber auch die Virusreaktivierung zu lebensbedrohlichen Krankheiten führen. Betroffen sind in diesen Patienten die Lunge, der Gastrointestinaltrakt, die Leber und das zentrale Nervensystem. Die häufigste ZNS-Erkrankung, gerade bei AIDS Patienten, ist die HCMV-Retinitis, die zur Erblindung führen kann.

Da die Zahl der Patienten, die sich im Rahmen einer Organ- oder Knochenmarkstransplantation einer immunsuppressiven Therapie unterziehen müssen oder durch AIDS immunsupprimiert sind, in den letzten Jahren beständig gestiegen ist, kommt der HCMV Infektion und ihrer Behandlung eine immer größere Bedeutung zu. Gegenwärtig stehen zur Behandlung einer HCMV-Infektion nur wenige Medikamente zur Verfügung. Hierzu gehören das Nukleosidanalogon Ganciclovir (GCV), das Nukleotidanalogon Cidofovir (CDV) und das Pyrophosphatanalogon Foscarnet (FOS). Sie alle inhibieren entweder direkt oder indirekt die HCMV DNA-Polymerase. Allerdings weisen diese Virostatika auch schweren Nebenwirkungen auf. Darüber hinaus ist vor allem im Rahmen einer Langzeittherapie das Auftreten resistenter HCMV-Stämme beobachtet worden (Cherrington et al., 1998; Smith et al., 1997). Aus diesem Grunde wird beständig nach neuen Therapieansätzen gesucht. Neuere, noch in der Entwicklung befindliche, Wirkstoffe inhibieren z.B. die Genprodukte UL89 und UL56, welche in den Reifungsprozess der Virionen und die Verpackung der viralen DNA involviert sind (Buerger et al., 2001; Krosky et al., 1998). Das Medikament Fomivirsen ist ein Antisense Oligonukleotid, welches gegen das Immediate Early Protein 2 (IE2) des HCMV gerichtet ist und so die Immediate Early Genexpression inhibiert (Cinatl et al., 2000; de Smet et al., 1999).

1.5 Latenz und Reaktivierung

Das humane Zytomegalievirus etabliert nach der Primärinfektion im Wirt eine lebenslange Latenz. Latenz ist hier definiert als persistierende Infektion bei der die virale DNA vorhanden ist, aber keine infektiösen Viren produziert werden (Banks und Rouse, 1992). Die genauen Mechanismen der Latenz und der Reaktivierung sind noch unklar. Eine Hauptort der HCMV Latenz sind die Vorläuferzellen von Monozyten/Granulozyten im Knochenmark (Kondo et al., 1996; Mendelson et al., 1996; Sindre et al., 1996; Slobedman und Mocarski, 1999; Taylor-Wiedeman et al.,

1991). In diesen latent infizierten Zellen liegt die virale DNA als zirkuläres Genom vor. Welche viralen Proteine funktionell in Latenz und Reaktivierung involviert sind, ist noch unklar. Zwar wurden Latenz-assoziierte Transkripte identifiziert, doch ist ihnen noch keine funktionelle Bedeutung zugeschrieben worden (Kondo und Mocarski, 1995). Die Reaktivierung scheint daher vor allem von zellulären Faktoren abzuhängen. Als ein wichtiges Ereignis bei der Reaktivierung wird die Zytokin-vermittelte Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen unter proinflammatorischen Bedingungen angesehen (Meier und Stinski, 1996; Soderberg-Naucler et al., 1997; Soderberg-Naucler und Nelson, 1999). Experimentell infizierte myeloide Vorläuferzellen reaktivieren latentes Virus, wenn sie in der Gegenwart von IFN γ oder TNF α kultiviert werden (Hahn et al., 1998), und in einem Mausmodell konnte durch die Behandlung latent infizierter Tiere mit TNF α die IE Genexpression in der Lunge induziert werden (Hummel et al., 2001). Die Kontrolle der viralen IE-Genexpression scheint hierbei von großer Bedeutung zu sein, da sie essentiell für die Virusreplikation ist (Greaves und Mocarski, 1998; Marchini et al., 2001; Mocarski et al., 1996). So scheint die Aktivierung der IE Genexpression, sei es durch TNF α und nachfolgende Aktivierung von NF κ B (Hummel und Abecassis, 2002; Prosch et al., 2002), durch Inhibition zellulärer Repressoren (Bain et al., 2003), oder durch Veränderung der Chromatinstruktur (Murphy et al., 2002), eine wichtige Rolle bei der Reaktivierung des Virus zu spielen.

1.6 Der lytische Infektionszyklus

Wie bei allen Herpesviren ist die Genexpression des humanen Zytomegalievirus zeitlich reguliert und lässt sich in drei Phasen unterteilen, und zwar die sehr frühe (*immediate early*, α -), frühe (*delayed early*, β -) und späte (*late*, γ -) Phase der Infektion (Mocarski, 1993).

Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle gelangt zunächst das Capsid zu den Kernporen, durch die das Genom in das Nukleoplasma entlassen wird. Das lineare DNA-Genom zirkularisiert und liegt dann als Episom im Kernplasma vor. Die Transkription und Replikation der viralen DNA findet im Zellkern statt (Mocarski, 2001).

In der ersten Phase der Infektion werden die sogenannten *immediate early* Gene exprimiert, dies geschieht unabhängig von *de novo* Proteinsynthese. Die *immediate*

early Proteine aktivieren die Expression der *delayed early* und der späten Gene und regulieren so den Ablauf der lytischen Infektion. Insgesamt kennt man vier Genomregionen, die sehr früh während des lytischen Infektionszyklus durch das Tegumentprotein pp71 aktiviert werden: UL36-38, ie1/ie2 (UL122-123), TRS1-IRS1 und US3 (Colberg-Poley, 1996; Stinski et al., 1983). Die überwiegende Mehrheit der Transkripte wird jedoch an einem einzigen Locus generiert, und zwar dem UL122-123, der deswegen auch als *major immediate early* (MIE)-Genregion bezeichnet wird (Chee et al., 1990).

Der sehr frühen Genexpression folgt die zweite, sogenannte *early* Phase der Infektion. Sie beginnt definitionsgemäß vor der viralen DNA Replikation und ist abhängig der vorangegangenen Expression der sehr frühen Genprodukte. Die *early* Phase lässt sich weiter unterteilen in die $\beta 1$ (*early*) und $\beta 2$ (*early late*) Phase unterteilen, je nach Zeitpunkt der maximalen Proteinexpression sowie der Sensitivität gegenüber Inhibitoren der viralen DNA-Synthese (Mocarski, 1993). Während der *early* Phase werden vor allem die Nichtstrukturproteine gebildet. Hierzu gehören die Enzyme und nukleinsäurebindenden Proteine, die für die Replikation des Virusgenoms erforderlich sind.

Die DNA-Replikation beginnt ungefähr 16 h nach der Infektion und erreicht ihr Maximum nach 60 bis 80 h (Stinski, 1978). Das zirkularisierte Virusgenom im Zellkern permissiver Zellen wird nach dem Prinzip des „*rolling circle*“ repliziert (McVoy et al., 1997). Als Ausgangsort für die DNA-Synthese dient ein spezifischer Replikationsorigin innerhalb der U_L-Region, der oriLyt (Anders et al., 1992; Masse et al., 1992). Der Replikationsapparat setzt sich im wesentlichen aus sechs HCMV-kodierten Proteinen zusammen, und zwar aus der DNA Polymerase (UL54), einem DNA Prozessivitätsfaktor (UL44), einem Einzelstrang-bindenden Protein (UL57) und einem aus drei Untereinheiten bestehenden Helikase-Primase-Komplex (UL70, UL102 und UL105) (Anders und McCue, 1996). Darüber hinaus sind zusätzliche HCMV Gene identifiziert worden, die eine Rolle bei der Replikation spielen. Hierzu gehören IE regulatorische Proteine (UL36-38, IRS1/TRS1 und UL122/123) wie auch zwei nukleär lokalisierte *early* Proteine (UL84, UL112/113) (Iskenderian et al., 1996; Pari und Anders, 1993; Pari et al., 1993). Die virale DNA-Synthese läuft in abgegrenzten nukleären Replikationskompartimenten ab, welche am Rande bestimmter Kernstrukturen, den PODs, entstehen (Penfold und Mocarski, 1997). Wie gezeigt werden konnte, akkumuliert an PODs während einer Infektion die virale DNA von

Adenoviren, SV40, HSV-1 und HCMV (Ishov und Maul, 1996; Ishov et al., 1997). Darüber hinaus sind sie auch die Orte der IE Transkription in HCMV (Ishov et al., 1997). Die von der UL112/113 Genregion exprimierten Phosphoproteine (Wright et al., 1988) regulieren die Bildung dieser Replikationszentren (Ahn et al., 1999; Penfold und Mocarski, 1997) und scheinen eine besondere Rolle bei der Rekrutierung der anderen viralen Replikationsfaktoren zu spielen. Die genaue Funktion des UL84 Genprodukts, einem 75 kDa Phosphoprotein, ist noch unklar. Während Sarisky und Hayward es als für die Replikation essentiellen Faktor identifizierten (Sarisky und Hayward, 1996), hatte in einer neueren Studie seine Abwesenheit keinen Einfluss auf die oriLyt-abhängige DNA-Synthese (Reid et al., 2003). In infizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass das UL84 Protein zusammen mit UL44 und dem IE2 Protein in den viralen Replikationskomplexen kolokalisiert (Xu et al., 2002). Darüber hinaus kann es auch direkt mit dem IE2 Protein interagieren (Spector und Tevethia, 1994), was zu einer Inhibition der IE2-vermittelten Transaktivierung und zu einer Verstärkung der negativen Autoregulation durch IE2 führt (Gebert et al., 1997). Das IE2-Protein, das wie die UL112/113 Proteine zu sehr frühen Zeitpunkten in der Nähe der PODs nachgewiesen werden kann (Ahn et al., 1999), scheint ebenfalls für eine effiziente oriLyt-abhängige DNA Replikation in primären humanen Fibroblasten benötigt zu werden (Sarisky und Hayward, 1996), aber auch hier ist die genaue Funktion noch unklar.

Als letzte Phase schließt sich die späte Phase der Infektion an, in der typischerweise die Strukturproteine des Virions gebildet werden. Sie lässt sich unterteilen in die $\gamma 1$ - (*leaky late*) und $\gamma 2$ - (*true late*) Phase. Während die Transkription der $\gamma 1$ -Phase durch Inhibition der viralen DNA Synthese lediglich reduziert wird, ist sie während der $\gamma 2$ -Phase obligat von der viralen DNA-Replikation abhängig (Stinski, 1978).

Im Zellkern findet der Zusammenbau der verschiedenen Strukturproteine zu Partikelvorläufern statt. Zuerst interagieren die Capsidproteine zu partikulären Vorstufen, die noch keine DNA enthalten. Dann wird ein Genomäquivalent in das Vorcapsid eingeschleust und an die nun DNA-haltigen Capside binden sich die Tegumentproteine. Sie assoziieren sich mit der inneren Kernmembran, in welche die Glykoproteine eingelagert sind. Von hier aus werden sie über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wo ihre Freisetzung erfolgt. Dies ist mit der Lyse der Wirtszelle verbunden. Wie gezeigt werden konnte,

gelangen neben den Virionproteinen auch vorgefertigte mRNAs in die neu gebildeten Viruspartikel (Bresnahan und Shenk, 2000; Greijer et al., 2000). Welche Funktion sie erfüllen, ist jedoch noch unklar.

1.7 Einflüsse auf die Wirtszelle - der Zellzyklus

Wie andere Herpesviren ist auch das humane Zytomegalievirus in der Lage, den Zellzyklusstatus der infizierten Zelle zu beeinflussen. *In vivo* infiziert HCMV normalerweise quieszente Zellen, in denen nur limitierte Mengen an Desoxyribonukleotiden und Kofaktoren für die DNA Replikation vorhanden sind. Dieser Mangel an S-Phase Faktoren stellt wahrscheinlich eher ungünstige Voraussetzungen für die virale DNA-Replikation dar. Nach HCMV-Infektion beobachtet man in diesen Zellen jedoch einen Anstieg der zellulären Transkription und Translation (Stinski, 1978), wie er in ähnlicher Weise auch bei einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren auftritt. So führt die HCMV-Infektion in quieszenten Zellen z.B. zu einer Induktion der fos-, jun- und myc-Genexpression (Boldogh et al., 1990).

Darüber hinaus findet man in diesen wie auch in infizierten proliferierenden Zellen eine starke Erhöhung der Cyclin E-Cdk2-Aktivität und des Phosphorylierungsgrades von pRb (Jault et al., 1995). Quieszente, primäre Zellen werden durch die HCMV-Infektion aus G0 zurück in den Zellzyklus getrieben, zu einem Übertritt in die S-Phase und einer Induktion der zellulären DNA-Synthese kommt es jedoch nicht (Bresnahan et al., 1996; Dittmer und Mocarski, 1997; Jault et al., 1995; Lu und Shenk, 1996). Vielmehr führt HCMV in produktiv infizierten humanen Fibroblasten zu einem Zellzyklusarrest in G1 (Dittmer und Mocarski, 1997; Jault et al., 1995; Lu und Shenk, 1996), wobei diese Zellen biochemisch Merkmale einer frühen S-Phase aufweisen (Bresnahan et al., 1996; Dittmer und Mocarski, 1997). Trotz Abwesenheit zellulärer Replikation ist die Expression S-Phase spezifischer Gene in HCMV-arretierten Zellen hochreguliert. Dazu zählen vor allem Replikationsfaktoren wie Topoisomerase II (Benson und Huang, 1990) und PCNA (Dittmer und Mocarski, 1997) sowie Enzyme des Nukleotidmetabolismus (Colberg-Poley und Santomenna, 1988; Isom, 1979; Lembo et al., 1999). Ferner wird auch Cyclin B in HCMV-arretierten Zellen exprimiert (Dittmer und Mocarski, 1997; Jault et al., 1995). Die Cyclin A-Expression hingegen ist auf transkriptioneller Ebene reprimiert (Salvant et al., 1998) und es ist keine Cyclin A-assoziierte Kinaseaktivität zu

beobachten (Bresnahan et al., 1996; Jault et al., 1995). Dies wird teilweise als mögliche Ursache für den Arrest am G1/S-Übergang betrachtet (Fortunato et al., 2000).

Die Stimulation der Nukleotid- und Replikationsfaktorsynthese bei gleichzeitiger Inhibition der zellulären DNA-Synthese scheint eine essentielle Voraussetzung für einen produktiven Replikationszyklus des Virus zu sein. Bei einer Infektion permissiver humaner Fibroblasten, die sich zum Zeitpunkt der Infektion bereits in der S- oder späteren Phasen des Zellzyklus befinden, kommt es zu einer Verzögerung der viralen Genexpression sowie der Replikation (Salvant et al., 1998), was vermutlich auf eine Inhibition der IE-Genexpression zurückzuführen ist (Fortunato et al., 2002). Darüber hinaus bewirkt eine Inhibition der Thymidylat-Synthetase, der Topoisomerase II oder von Cdk2 eine abortive Infektion (Benson und Huang, 1988; Bresnahan et al., 1997; Lembo et al., 2000).

Der genaue Mechanismus der HCMV-vermittelten Inhibition der zellulären DNA-Synthese ist noch unklar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass HCMV an den zellulären Replikationsorigins das sogenannte Replikationslicensing verhindert. In HCMV-infizierten Zellen kommt es nicht zur vollständigen Assemblierung des zellulären Replikationsinitiationskomplexes, da die Bindung des Mini-Chromosom-Maintenance (MCM)- Komplexes an das Chromatin inhibiert ist (Biswas et al., 2003; Wiebusch et al., 2003).

Bisher wurden zwei virale Faktoren identifiziert, die an der Induktion eines Zellzyklusarrests in HCMV-infizierten Zellen beteiligt sein könnten.

Das Tegumentprotein pUL69, ein Transkriptionsfaktor, führt bei transienter Expression in Zellen zu einem G1-Arrest (Lu und Shenk, 1999). Nach einer Deletion dieses Proteins sind rekombinante Viren nur noch eingeschränkt in der Lage, einen Zellzyklusarrest induzieren (Hayashi et al., 2000). Als zweiter wichtiger viraler Faktor gilt das IE2 Protein, welches ebenfalls einen Zellzyklusarrest induzieren kann. Auf seine zellzyklusregulatorischen Eigenschaften soll später noch genauer eingegangen werden.

1.8 Die *major immediate early* (MIE)-Genregion

Wie bereits erwähnt, wird der größte Teil der *immediate early* Transkripte von der MIE-Genregion (UL122-123; ie1/ie2) generiert. Sie repräsentiert den wohl am besten untersuchten Genlocus innerhalb des HCMV-Genoms. Die ie1/ie2-Genregion kodiert für die *immediate early* Proteine IE1 und IE2 sowie weitere Spleißprodukte und Isoformen. Sie befindet sich innerhalb des langen, nicht repetitiven Sequenzabschnitts des HCMV Genoms und ihre offenen Leserahmen werden dementsprechend als UL122 und UL123 bezeichnet. Die Regulation der IE1/IE2-Genexpression erfolgt über einen starken und komplex-regulierten Promotor-Enhancer (Boshart et al., 1985; Meier und Pruessner, 2000; Meier und Stinski, 1996; Nelson et al., 1990). Darüber hinaus kann auch der Modulator, der vom Enhancer durch die sogenannte *unique region* getrennt ist, die Expression beeinflussen (Meier und Stinski, 1996). Die Funktion der *unique region* ist bislang noch unklar. In Abbildung 2 ist die Lokalisation und der Aufbau der MIE Genregion dargestellt.

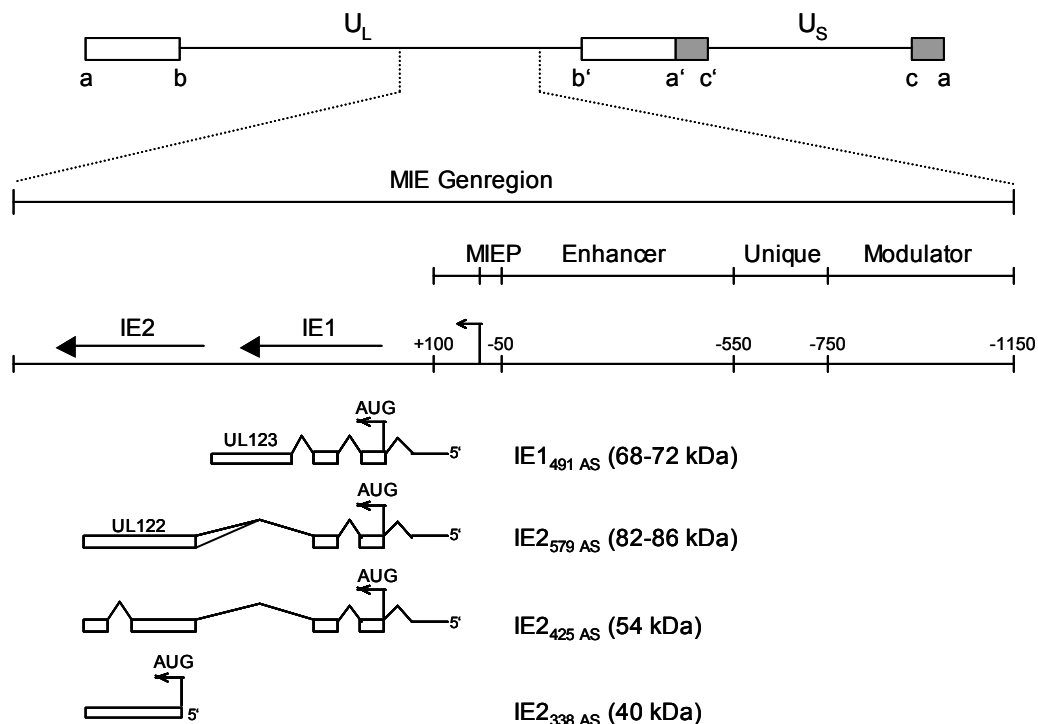


Abb. 2: Lokalisation und Aufbau der MIE Genregion

Die MIE-Genregion befindet sich innerhalb des langen, nicht repetitiven Sequenzabschnitts (U_L -Segment) des Genoms. Ihre offenen Leserahmen werden als UL122 und UL123 bezeichnet. Der regulatorische Bereich der ie1/ie2-Genregion besteht aus dem Modulator, der *unique region*, dem Enhancer und dem MIE-Promotor. Dargestellt ist die Lokalisation im Genom sowie der Aufbau der MIE-Genregion. Ferner zeigt die Abbildung den Aufbau der Transkripte für das IE1 und das IE2 Protein sowie einige Isoformen.

Genprodukte

Die *ie1/ie2*-Genregion besteht aus 5 Exons und enthält zwei Polyadenylierungs-Signalsequenzen in Exon 4 und Exon 5 (Stenberg et al., 1984) so dass durch alternative Spleißvorgänge verschiedene mRNAs transkribiert werden können. Das mengenmäßig am meisten gebildete *immediate-early* Protein ist das IE1 Protein (Bezeichnung: IE1, IE-72 oder pUL123), ein nukleär lokalisiertes Phosphoprotein (69-72 kD), das von einer mehrfach gesplice mRNA aus den Exons 1-4 translatiert wird. Das IE1 Protein aktiviert über die NFκB-Bindungsstellen im MIE Promotor seine eigene Expression und ist auch an der Aktivierung der *delayed early* und späten Genexpression beteiligt (Mocarski et al., 1996). Virale Mutanten, in denen das IE1 Protein komplett deletiert ist, sind noch in der Lage, zu replizieren, wenn mit einer hohen MOI (multiplicity of infection) infiziert wird. Das IE1 Protein scheint jedoch essentiell zu sein, wenn Zellen nur mit einer geringen MOI infiziert werden, denn hier beobachtet man bei IE1-deletierten Viren in den Zellen eine deutlich reduzierte Expression der *delayed early* Gene, was zu einem Wachstumsdefekt der mutierten Viren führt (Ahn und Hayward, 2000; Gawn und Greaves, 2002; Greaves und Mocarski, 1998).

Das IE2 Protein (Bezeichnungen: IE2, IE-86 oder UL122a) ist ebenfalls ein nukleäres Phosphoprotein, dessen aminoternale 85 Aminosäuren mit denen des IE1 Proteins identisch sind. Es fungiert als potenter transkriptioneller Aktivator der viralen Genexpression. Das IE2 Protein des HCMV Stammes AD169, das auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand, besteht aus 580 Aminosäuren (die in der Literatur üblicherweise angegebenen 579 AS beziehen sich auf das IE2 Protein aus dem HCMV Town Stamm) und weist im SDS-Polyacrylamidgel eine Größe von 80-86 kDa auf. Während das IE1 Protein den MIE Promotor aktiviert, ist das IE2-Protein in der Lage, diesen zu reprimieren. Beide MIE-Proteine können jedoch synergistisch zur transkriptionellen Aktivierung einiger *early* und *late* Gene von HCMV beitragen (Depto und Stenberg, 1989; Kerry et al., 1994). Andere Promotoren werden durch IE2 alleine aktiviert und IE1 oder andere IE-Genprodukte können diesen Effekt nur verstärken (Colberg-Poley et al., 1992; Klucher et al., 1993; Malone et al., 1990). Neben IE1 und IE2 werden durch alternative Spleißvorgänge mehrere kürzere IE-Isoformen gebildet, wie z.B. IE55/IE2 (55kDa) (Baracchini et al., 1992), IE18/IE2 (18 kDa) (Spector, 1996; Stenberg, 1996) und IE19/IE1 (38 kDa) (Shirakata et al., 2002). Ihre Funktion während der viralen Infektion ist zum Teil noch unklar, allerdings konnte für das IE55-Protein gezeigt werden, dass es wie IE1 den MIE Promotor aktivieren kann (Baracchini et al.,

1992). So scheint die eigentliche Nettoaktivierung des Promotors von dem Verhältnis des IE1, IE2 und IE55 zueinander abzuhängen. Im Gegensatz zu den bisher genannten IE-Proteinen ist das mengenmäßig am stärksten produzierte Genprodukt der MIE Genregion, das IE2_{338aa}/IE2p40 (338 Aminosäuren, 40 kDa), ein Protein der späten Phase (*true late protein*). Es wird durch Transkription von einem intern im UL122-Leserahmen gelegenen Promotor generiert und entspricht den C-terminalen Sequenzen des IE2 Proteins (Jenkins et al., 1994; Stenberg, 1996).

Regulation der Genexpression

Der MIE Modulator

Der Modulator befindet sich zwischen Position -750 und -1150 relativ zum Transkriptionsstart. Er wurde identifiziert aufgrund seiner Eigenschaft, in transienten Transfektionen die Transkription entweder zu stimulieren oder zu reprimieren, je nachdem welcher Zelltyp verwendet wurde bzw. welchen Differenzierungsgrad die Zellen aufwiesen (Nelson und Groudine, 1986; Nelson et al., 1987). Wie sich zeigte, reprimiert der Modulator die Transkription in undifferenzierten Tera-2-Zellen (Shelbourn et al., 1989) und monozytischen THP-1-Zellen (Huang et al., 1996), vermag dies jedoch nicht mehr, sobald die Zellen differenziert bzw. stimuliert wurden. Die Mechanismen der Regulation der Transkription durch den Modulator sind noch unklar, zumal er in einigen Zelltypen wie z.B. B-Lymphozyten und Fibroblasten auch zu einer Promotoraktivierung führen kann (Lubon et al., 1989; Nelson et al., 1987). Teilweise scheint die Bindung verschiedener zellulärer Proteine wie z.B. des Transkriptionsfaktors YY1 mit zur Repression in undifferenzierten Zellen beizutragen (Liu et al., 1994; Sinclair et al., 1992). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Repression des MIE Promotors in undifferenzierten Zellen auch über eine Veränderung der Chromatinstruktur vermittelt wird und diese hauptsächlich im Bereich der Modulatorregion stattfindet (Murphy et al., 2002; Nelson und Groudine, 1986). Für die IE-Genexpression scheint der Modulator jedoch nicht essentiell zu sein. Eine Deletion dieser Region in rekombinanten Viren hatte keinen Einfluss auf die ie1/ie2-Genexpression, sei es in differenzierten oder in undifferenzierten Zellen (Meier und Stinski, 1997).

Der MIE Enhancer

Der MIE Enhancer gehört zu den stärksten bekannten Enhancern (Thomsen et al., 1984) und findet eine breite Anwendung zur heterologen Genexpression in experimentellen und therapeutischen Vektoren. Die starke Aktivierung, die durch den MIE Enhancer vermittelt wird, ist auf eine dichte Anhäufung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen zurückzuführen (Niller und Hennighausen, 1990; Niller und Hennighausen, 1991). Hierzu gehören unter anderem Bindungsstellen für CREB/ATF, NF- κ B/Rel, Sp1, AP1, NF-1 und YY-1 (dargestellt in (Meier und Stinski, 1996)). Kurz nach Infektion der Wirtszelle werden mehrere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, AP-1, Sp-1 und CREB/ATF, induziert und aktivieren die Expression vom MIE Promotor/Enhancer durch die Bindung an repetitive Sequenzelemente, die je nach ihrer Größe als 16-, 18-, 19- und 21 bp *repeats* bezeichnet werden (Thomsen et al., 1984). Wie bereits erläutert, spielen die NF- κ B Bindungsstellen eine wichtige Rolle bei der IE1-vermittelten Aktivierung des Promotors (Cherrington und Mocarski, 1989). Die 19-bp *repeats* enthalten ein cAMP-responsives Element (ATF-Bindungsstelle), über die eine Transaktivierung durch das pp71-Virionprotein vermittelt wird (Liu und Stinski, 1992). Aufgrund der vielen verschiedenen Bindungsstellen variiert die Aktivität des Enhancers in Abhängigkeit vom Zelltyp und der zellulären Differenzierung (Meier und Stinski, 1996). Seine Aktivität hängt ab von der Anwesenheit der jeweiligen Transkriptionsfaktoren und wird zusätzlich beeinflusst vom benachbarten Modulator.

Der MIE Promotor

Der MIE Promotor erstreckt sich von -50 bis +1 relativ zum Transkriptionsstart. Er wird mit fortschreitender Infektion durch einen IE2-abhängigen Prozess reprimiert (Stenberg, 1996). Hierbei bindet das IE2-Protein, vermutlich als Homodimer (Macias et al., 1996) an ein spezifisches Signal, die *cis-repression sequence* (crs) nahe dem Transkriptionsstart (Cherrington et al., 1991; Liu et al., 1991; Pizzorno und Hayward, 1990).

Die crs wurde identifiziert als ein 14-bp Sequenzelement mit teilweise palindromischer Struktur (Cherrington et al., 1991; Liu et al., 1991; Pizzorno und Hayward, 1990). Sie besteht aus 2 Kopien des Dinukleotids CG, die durch einen A/T-reichen Abschnitt von 10 Nukleotiden getrennt sind. Über die crs kann eine IE2-abhängige Repression auch auf heterologe Promotoren übertragen werden (Cherrington et al., 1991; Liu et al.,

1991; Pizzorno und Hayward, 1990). Die Repression durch das IE2 Protein ist unabhängig von der Orientierung der crs, aber abhängig von der Lokalisation, da die Repression abnimmt, wenn der Abstand zwischen der crs und der TATA Box erhöht wird (Lee et al., 1996). In Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die flankierenden CG Dinukleotide kritisch für die Bindung sind und dass zudem der Abstand zwischen den Dinukleotiden, bestimmt durch die Anzahl der internen Nukleotide, entscheidender ist, als deren genaue Sequenz (Chiou et al., 1993; Waheed et al., 1998). Allerdings scheint der A/T-reiche Charakter der internen Nukleotide die Bindung zu begünstigen (Waheed et al., 1998). Wie die Repression des Promotors durch das IE2 Protein vermittelt wird, ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Da die crs zwischen der TATA Box und dem Transkriptionsstart des MIE Promotors lokalisiert ist, scheint dies die Assemblierung des Transkriptionsinitiationskomplexes sterisch zu behindern. So konnte gezeigt werden, dass das IE2 Protein die Transkription vom MIE Promotor nur während der Assemblierung des Transkriptionsinitiationskomplexes reprimieren kann, nicht aber während des Elongationsprozesses (Wu et al., 1993). Die crs erstreckt sich von Position –13 bis –1 relativ zum Transkriptionsstart. In *in vitro* Analysen konnte die Bindung eines noch unbekannten zellulären Proteins von ca. 105 kDa Größe in diesem Bereich nachgewiesen werden, welches einen aktivierenden Einfluss auf den Promotor hat. Da die Bindungsstelle dieses aktivierenden Proteins mit der des IE2 Proteins überlappt, ist es möglich, dass das IE2-Protein die Bindung des Aktivators verhindert. (Huang und Stinski, 1995; Macias et al., 1996).

Innerhalb des MIE Promotor/Enhancers sind weitere crs-ähnliche IE2-Bindungsstellen identifiziert worden. Sie liegen im Bereich von –240 bzw. –170 und können in transienten Transfektionsexperimenten zur Repression des Promotors durch IE2 mit beitragen (Huang und Chen, 2002).

Auch im Promotor des US3-Gens, welches ebenfalls ein *immediate early* Gen ist, konnte eine crs unmittelbar vor dem Transkriptionsstart identifiziert werden (Biegalka, 1995). Eine Mutation dieser crs führt im viralen Kontext zu einer gesteigerten US3-Genexpression zu späten Zeitpunkten der Infektion (Lashmit et al., 1998).

1.9 Das IE2-Protein

Das IE2-Protein repräsentiert den wichtigsten Regulationsfaktor innerhalb des lytischen Infektionszyklus. Es ist ein essentieller Transaktivator der viralen Genexpression und vermittelt die Repression des MIE Promotors zu späten Zeiten der Infektion. In Übereinstimmung damit können HCMV-Mutanten, in denen das IE2-Protein deletiert oder durch Mutationen inaktiviert ist, keinen produktiven Replikationszyklus vollziehen, da die Aktivierung der early Gene blockiert ist (Heider et al., 2002; Marchini et al., 2001; White et al., 2004).

Modifikationen

Das IE2-Protein ist zahlreichen posttranslationalen Modifikationen unterworfen. Dies führt vermutlich auch dazu, dass es trotz einer errechneten Molekülmasse von ca. 64 kDa im SDS-Polyacrylamidgel bei einer Größe von 82 bis 86 kDa auftritt. Im IE2-Protein befinden sich mehrere Glykosylierungsstellen und insgesamt über 100 Serine, Threonine und Tyrosine, die potentiell durch Proteinkinasen phosphoryliert werden können. Für einige dieser Aminosäuren konnte nachgewiesen werden, dass sie *in vivo* und *in vitro* durch zelluläre Kinasen phosphoryliert werden (Harel und Alwine, 1998). Allerdings ist noch unklar, welche Bedeutung die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren für die Funktionalität des Proteins hat. Ein Virus, bei dem einzelne Phosphorylierungsstellen im IE2-Protein mutiert wurden, zeigte kein verändertes Wachstumsverhalten (Heider et al., 2002).

Zusätzlich kann das IE2-Protein durch eine kovalente Bindung an die Ubiquitin-Homologe SUMO-1 und SUMO-2 modifiziert werden (Ahn et al., 2001; Hofmann et al., 2000; Lee et al., 2003), was zum Auftreten einer 105 kDa-Variante des IE2-Proteins führt. Diese sogenannte SUMOylierung scheint die Transaktivierung des Proteins zu beeinflussen. Bei einer Mutation der bisher identifizierten SUMOylierungs-Stellen an Aminosäure 175 und 180 kommt es zu einer Reduktion der Transaktivierungsfähigkeit (Hofmann et al., 2000). Die genaue Funktion der IE2-SUMOylierung während der Infektion ist jedoch noch unklar.

Transaktivierung

IE2 kann zusammen mit IE1 synergistisch verschiedene *early* und *late* Promotoren aktivieren. Darüber hinaus fungiert IE2 allein auch als promiskuitöser Transaktivator zahlreicher Promotoren zellulären oder viralen Ursprungs, wie z.B. des zellulären Cyclin E Promotors, des c-fos Promotor sowie des HIV-LTR Promotor (dargestellt in (Mocarski, 2001; Spector, 1996; Stenberg, 1996)).

Die Mechanismen der IE2-vermittelten Transaktivierung sind nicht in allen Einzelheiten bekannt. IE2 scheint auf verschiedenen Wegen aktivieren zu können, hierbei sind sowohl Protein-Protein- als auch Protein-DNA-Interaktionen beteiligt. Einige Promotoren, wie der zelluläre c-fos Promotor, der hsp70-Promotor und der HIV-LTR-Promotor, werden durch IE2 über einen TATA-Box-abhängigen Mechanismus aktiviert. Dies wird vermutlich über eine Interaktion des IE2 mit basalen Transkriptionsfaktoren wie TFIIB (Caswell et al., 1993) und TBP (Hagemeier et al., 1992; Jupp et al., 1993) vermittelt. So scheint das IE2-Protein als eine Art Adapter zu fungieren, der die TFIID-assoziierten Faktoren auf dem Promotor stabilisiert. Darüber hinaus kann es selbst auch TAF-ähnliche Funktionen übernehmen (Lukac et al., 1997).

Das IE2-Protein kann auch mit Promotor-spezifischen Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB (Lang et al., 1995; Schwartz et al., 1996), AP-1 (Scully et al., 1995), Egr-1 (Yoo et al., 1996) oder Sp1/Pu.1 (Wara-aswapati et al., 1999) interagieren und auf diese Weise eine Promotoraktivierung vermitteln.

Neben der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren scheint die direkte DNA-Bindung bei der Transaktivierung eine Rolle zu spielen. In einigen Promotoren, wie dem frühen UL112/113 Promotor sowie dem zellulären Cyclin E Promotor, konnten crrs-ähnliche Sequenzen identifiziert werden. Sie ermöglichen die Bindung von IE2 und tragen so zur Promotoraktivierung bei (Arlt et al., 1994; Bresnahan et al., 1998; Schwartz et al., 1994). Im UL112/113 Promotor befinden sich drei starke IE2-Bindungsstellen im Bereich zwischen -290 bis -120 relativ zum Transkriptionsstart und eine schwächere Bindungsstelle zwischen Position -71 und -66. Eine Deletion der Bindungsstellen im Bereich zwischen -290 und -120 führt zu einer Reduktion der IE2-vermittelten Aktivierung des Promotors, allerdings kann der verbleibende Promotor immer noch signifikant aktiviert werden. Wie sich zeigte, wird die Aktivierung hier im wesentlichen über eine ATF/CREB Bindungsstelle (Nukleotide -78 bis -56) erreicht, da das IE2

Protein direkt mit CREB wie auch mit p300 und dem CREB-bindenden Protein (CBP) interagieren kann (Lang et al., 1995; Schwartz et al., 1996). Während der viralen Infektion scheinen, je nach Zeitpunkt, beide Mechanismen der Aktivierung zum Einsatz zu kommen (Rodems et al., 1998).

Ein weiterer Mechanismus der Transaktivierung besteht in der Interaktion des IE2-Proteins mit Chromatin-modellierenden Faktoren. Histon-Acetyltransferasen führen zur Acetylierung der Histone, was die Histon-DNA-Interaktion abschwächt und zu einer Lockerung der Chromatinstruktur führt (Loidl, 1994). *In vivo* ist eine solche Hyperacetylierung verbunden mit einer Aktivierung der Genexpression (Hebbes et al., 1988; Pazin und Kadonaga, 1997; Turner, 1991). Von einigen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB und p300, konnte bereits gezeigt werden, dass sie intrinsische Histon-Acetyltransferase-(HAT-) Aktivität besitzen (Bannister und Kouzarides, 1996; Martinez-Balbas et al., 1998; Ogryzko et al., 1996). Auch das IE2-Protein scheint in der Lage zu sein, über Interaktion mit Histon-Acetyltransferasen Einfluss auf die Chromatinstruktur zu nehmen. So lässt sich sowohl in HCMV-infizierten wie auch in IE2-transfizierten Zellen HAT-Aktivität ko-immunopräzipitieren. Darüber hinaus konnte die direkte Interaktion des IE2-Proteins mit der Histon-Acetyltransferase P/CAF nachgewiesen werden (Bryant et al., 2000; Klucher et al., 1993).

Weitere Interaktionspartner des IE2-Proteins sind zellzyklus-regulatorische Proteine wie das Rb-Protein sowie p53, wenngleich die biologische Funktion dieser Interaktionen noch unklar ist. IE2 bindet pRb (Hagemeier et al., 1994; Sommer et al., 1994) und kann seine repressorische Wirkung auf E2F-responsive Promotoren aufheben (Fortunato et al., 1997; Hagemeier et al., 1994). In Rb-negativen Saos-2-Zellen kann IE2 die Ausbildung eines „*flat cell*“ Phänotyps, der durch pRb Überexpression erzeugt wird, entgegenwirken (Fortunato et al., 1997).

IE2 konnte auch im Komplex mit p53 nachgewiesen werden (Speir et al., 1994) und kann dessen Funktion als transkriptioneller Aktivator inhibieren. Die biologische Funktion dieser Interaktion ist allerdings noch unklar. Die Checkpoint-Funktion des p53 wird durch seine Interaktion mit dem IE2 nicht beeinträchtigt (Bonin und McDougall, 1997) und mögliche anti-apoptotische Aktivitäten, die für das IE2 Protein beschrieben worden sind, scheinen nicht von p53 abhängig zu sein (Zhu et al., 1995).

Autorepression

Zusätzlich zu seiner Rolle als essentieller Transaktivator fungiert das IE2 Protein auch als transkriptioneller Repressor seines eigenen Promotors. Wie bereits erläutert ist hierfür die Bindung des IE2 an die *crs* verantwortlich. Die IE2-vermittelte Repression des MIE Promotors ist in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen worden (Hermiston et al., 1990; Macias und Stinski, 1993; Pizzorno und Hayward, 1990; Pizzorno et al., 1991; Pizzorno et al., 1988; Stenberg et al., 1990). Schwierigkeiten bereitete jedoch lange Zeit der direkte Nachweis der DNA Bindung, da in Zellextrakten von IE2-transfizierten oder HCMV-infizierten Zellen bzw. mit *in vitro* translatiertem IE2-Protein keine DNA-Bindung beobachtet werden konnte (Chiou et al., 1993). Aus diesem Grunde wurden die meisten Studien hierzu mit IE2-Protein, welches in bakteriellen Systemen exprimiert wurde, durchgeführt. Mit Hilfe dieser rekombinanten Proteine, aber auch in einem Yeast-One-Hybrid Assay konnte so die IE2-DNA-Bindung untersucht werden (Ahn et al., 1998; Chiou et al., 1993; Jupp et al., 1993; Lang und Stamminger, 1993; Waheed et al., 1998). Eine mögliche Ursache für die beobachteten Schwierigkeiten könnte in den besonderen Bindungseigenschaften des IE2-Proteins begründet sein. IE2 bindet an die DNA über Interaktionen mit der kleinen Furche (Lang und Stamminger, 1994) und diese Bindung ist sensitiv gegenüber bestimmten nicht-spezifischen Kompetitor-DNAs wie poly(dIdC)·(dIdC) (Chiou et al., 1993; Lang und Stamminger, 1993). Bei einem Vergleich der bisher identifizierten IE2-DNA-Bindungsstellen fällt zudem auf, dass es keine eigentliche Konsensussequenz gibt. So scheint die Bindung des IE2-Proteins weniger durch die exakte Sequenz als durch strukturelle Eigenschaften der DNA bestimmt zu werden (Lang und Stamminger, 1994). In einer Studie wurde eine mögliche Maskierung der Bindungsaktivität des IE2 durch posttranslationale Phosphorylierung diskutiert (Waheed et al., 1998), von anderer Seite konnte jedoch eine Bindung des IE2 nachgewiesen werden, wenn das Protein aus Extrakten von transient transfizierten *non small cell lung cancer* Zellen (NCI-H1299) über eine Heparin-Sepharose Cl6B Säule aufgereinigt wurde (Huang und Chen, 2002). Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die *in vitro* Bindungsfähigkeit durch die Art der Präparation der Proteinextrakte beeinflusst wird.

Zellzyklusregulation

Wie bereits erwähnt wurde, konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden, dass IE2 auch zellzyklusregulatorische Aktivitäten besitzt, deren Effekte denen des HCMV

ähnlich sind. Die transiente Expression des IE2-Proteins führt in verschiedenen Zelllinien und auch in primären Fibroblasten zu einem Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang (Kronschnabl et al., 2002; Murphy et al., 2000; Noris et al., 2002; Wiebusch und Hagemeier, 1999; Wiebusch und Hagemeier, 2001). Dieser Zellzyklusarrest findet in der Gegenwart von erhöhten Cyclin E-Leveln statt (Wiebusch et al., 2003; Wiebusch und Hagemeier, 2001). Zudem sind, ähnlich wie in HCMV infizierten Zellen, die mRNA Level zahlreicher in den Nukleotidmetabolismus und die DNA Replikation involvierter Gene erhöht (Song und Stinski, 2002). In Übereinstimmung damit kann IE2 in quieszenten Zellen den Wiedereintritt in den Zellzyklus und die S-Phase induzieren (Castillo et al., 2000; Sinclair et al., 2000). So scheint IE2, ähnlich wie das HCMV, sowohl pro- als auch antiproliferative Aktivitäten in sich zu vereinen (Wiebusch et al., 2003).

1.10 Struktur-Funktionsanalysen des IE2-Proteins

Aufgrund seiner essentiellen Rolle während des Replikationszyklus sowie seiner zahlreichen Funktionen stand das IE2-Protein im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Ein wesentliches Ziel war und ist dabei die Identifikation der funktionellen Domänen innerhalb des Proteins und die Frage nach der biologischen Relevanz einzelner Funktionen. Da es nicht möglich ist, replikationsfähige IE2-defiziente Viren zu generieren, und komplementierende Zelllinien nicht zur Verfügung stehen, beruhen die meisten Studien auf transienten Transfektionssystemen. Zwar gibt es mittlerweile auch Untersuchungen mit rekombinanten Viren, deren IE2 mutiert ist, doch hat sich gezeigt, dass die beobachteten Effekte nur sehr eingeschränkt auf den Wegfall einzelner Funktionen, mit Ausnahme der Transaktivierung, zurückzuführen sind (Heider et al., 2002; Sanchez et al., 2002; White et al., 2004). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des IE2 Proteins und seiner funktionellen Domänen.

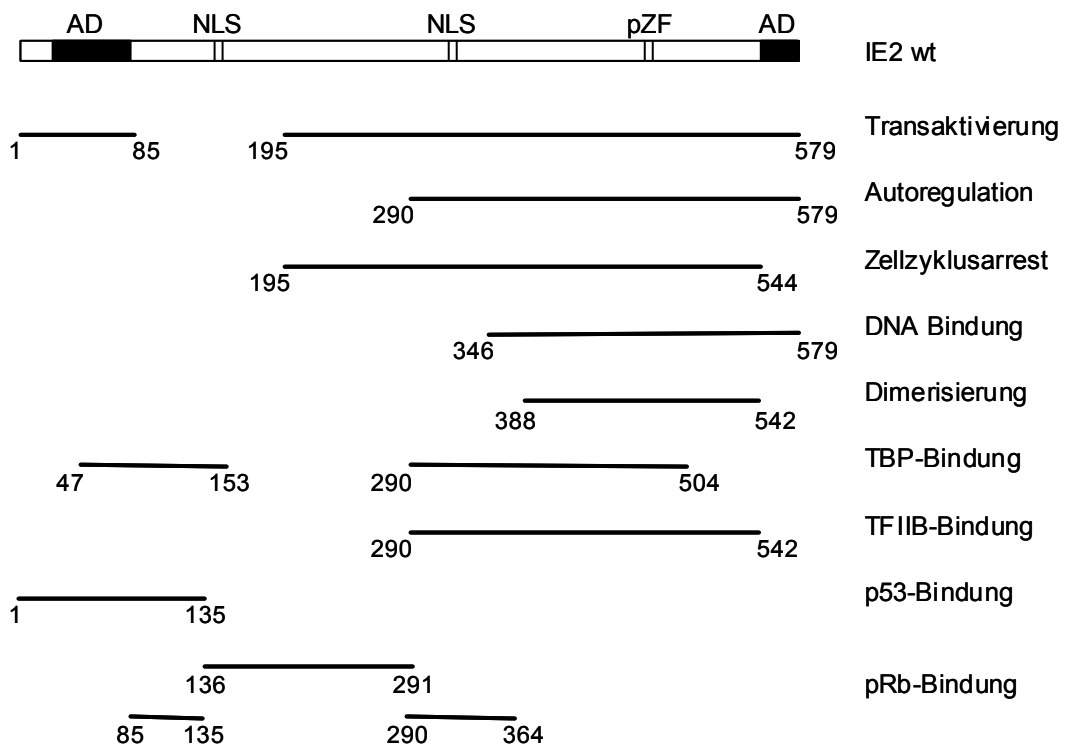


Abb. 3: Regulatorische Domänen des HCMV IE2-Proteins

Schematische Darstellung des IE2-Proteins und die Lage seiner funktionellen und Protein-bindenden Domänen. Das IE2-Protein besitzt zwei Signalsequenzen für die nukleäre Lokalisation (NLS, Aminosäuren (AS) 145-151 und 313-346) und am N- sowie am C-Terminus jeweils eine unabhängige, azide Aktivierungsdomänen (AD). Eine postulierte Zinkfingerdomäne (pZF) befindet sich zwischen AS 428 und 452.

Das IE2-Protein besitzt zwei Signalsequenzen für die nukleäre Lokalisation (NLS) zwischen den AS 145-151 und AS 313 –346, von denen mindestens eine vorhanden sein muss, um die Lokalisation im Zellkern zu gewährleisten (Pizzorno et al., 1991).

Zwei unabhängige, azide Transaktivierungsdomänen am N- und am C-Terminus sind essentiell für die Transaktivierung (Pizzorno et al., 1991). Darüber hinaus ist jedoch fast die gesamte C-terminale Hälfte des Proteins, beginnend von Aminosäure 195, in die Transaktivierung involviert (Malone et al., 1990; Pizzorno et al., 1991; Stenberg et al., 1990). Innerhalb der Transaktivierungsdomäne befinden sich auch die Sequenzen, die für die Interaktion mit basalen Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind. So erfordert die Bindung an TFIIB die Aminosäuren 290 bis 542 (Caswell et al., 1993) und die Bindung an TBP die Aminosäuren 290 bis 504 sowie 47 bis 153 (Caswell et al., 1993; Jupp et al., 1993). Zusätzlich scheint diese Region an der Interaktion des IE2 mit Promotor-spezifischen Transkriptionsfaktoren beteiligt zu sein, so ist z.B. die minimale

CREB Bindungsdomäne zwischen Aminosäure 290 und 410 lokalisiert worden (Lang et al., 1995). Die für die Autoregulation und DNA Bindung verantwortlichen Proteindomänen liegen ebenfalls im C-Terminus des Proteins. Die Autoregulation erfordert den Bereich zwischen Aminosäure 290 und 579 (Hermiston et al., 1990; Pizzorno et al., 1991; Stenberg et al., 1990). Die DNA-Bindungsdomäne liegt innerhalb dieser Region und reicht von Aminosäure 346 bis 579 (Chiou et al., 1993). Allerdings scheinen auch Sequenzen außerhalb dieser Domäne einen Einfluss auf die DNA-Bindungsfähigkeit des IE2 Proteins zu besitzen, da eine interne Deletion zwischen Aminosäure 313 und 346 in einem *yeast one hybrid*-Assay, zu einem Verlust der DNA-Bindung führte (Ahn et al., 1998). Rückschlüsse darauf, welche Bereiche des Proteins in Autoregulation und DNA-Bindung involviert sind, ermöglichten auch die Untersuchungen der IE2-Isoformen IE55 und IE2p40. Das IE55 Protein ist nicht in der Lage, den MIE Promotor zu reprimieren. Es aktiviert ihn vielmehr und gleicht damit in seiner Funktion dem IE1-Protein (Baracchini et al., 1992). Da dem IE55 im Vergleich zum IE2 lediglich die Aminosäuren 365 bis 519 fehlen, scheint diesen eine besondere Bedeutung bei der Vermittlung dieser Funktionen zuzukommen. Das late IE2p40-Protein hingegen, welches durch die Transkription von einem internen Promotor generiert wird und die C-terminalen 338 Aminosäuren IE2 Proteins enthält, ist in der Lage, den MIE Promotor zu reprimieren (Jenkins et al., 1994). Wie gezeigt werden konnte, erfolgt die Bindung des IE2-Proteins an die DNA als Dimer und eine Mutation innerhalb der Dimerisierungsdomäne, die sich zwischen AS 388 und 542 befindet, führt zu einem Verlust der DNA-Bindung (Ahn et al., 1998; Chiou et al., 1993). Eine besondere Rolle bei der DNA-Bindung wurde einer postulierten Zinkfingerdomäne zwischen den Aminosäuren 428 und 452 zugeschrieben. Hierbei handelt es sich um einen singulären Cystein-Histidin-Zinkfinger. Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Mutation entweder der Cysteine oder der Histidine sowohl die DNA-Bindung als auch die Fähigkeit zur Autoregulation komplett zerstört wird (Bresnahan et al., 1998; Jupp et al., 1993; Macias et al., 1996; Macias und Stinski, 1993; Tsai et al., 1997).

Auch die Zellzyklusarrestfunktion scheint hauptsächlich durch den C-Terminus des Proteins vermittelt sein werden (Wiebusch und Hagemeier, 1999).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Funktionen, sind die für die p53- und pRB-Bindung erforderlichen Aminosäuren hauptsächlich im N-Terminus des IE2 Proteins lokalisiert. Die Bindung an p53 erfolgt über die Aminosäuren 1-135 und in verschiedenen Studien konnten drei Bereiche identifiziert werden, die für die pRb-

Bindung verantwortlich sind: AS 85-135, AS 136-290, AS 291-364 (Sommer et al., 1994) oder AS 290-390 (Hagemeier et al., 1994).

Wie Abbildung 3 zeigt, scheint vor allem der C-Terminus eine besondere Rolle für die Funktionsfähigkeit des Proteins zu spielen. Da hier eine Vielzahl der regulatorischen Domänen zu überlappen scheint, erschwert dies eine gezielte Analyse einzelner Aktivitäten. Allerdings sind noch immer nicht alle funktionellen Domänen im Detail charakterisiert, da sie teilweise nur mittels größerer Mutationen analysiert wurden. Feinere Mutationsanalysen des IE2-Proteins sollten daher dazu beitragen, das in Abbildung 3 dargestellte Schema zu präzisieren.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das HCMV IE2 Protein ist ein multifunktionales Protein, das essentiell für den lytischen Infektionszyklus ist. Somit sind Viren, in denen das IE2 Protein deletiert oder schwerwiegend mutiert wurde, nicht replikationsfähig (Heider et al., 2002; Marchini et al., 2001). Gleichzeitig stehen, wahrscheinlich aufgrund des IE2-vermittelten Zellzyklusarrests, stabil exprimierende Zelllinien nicht zur Verfügung, um den IE2-Verlust *in trans* zu komplementieren. Da gerade im C-Terminus des Proteins zahlreiche regulatorische Domänen zu überlappen scheinen, stellt dies eine weitere Schwierigkeit bei der spezifischen Analyse einzelner Funktionen dar.

Aus diesem Grunde ist eine präzise Kenntnis der funktionellen Domänen im IE2-Protein absolut notwendig, wenn es darum geht, einzelne Funktionen gezielt zu manipulieren, um ihre physiologische Bedeutung zu untersuchen. Bisher ist ein solch gezieltes Ausschalten von Funktionen, mit Ausnahme der Transaktivierung, nicht möglich. Nicht alle funktionellen Domänen sind im Detail untersucht und charakterisiert worden und Informationen zur Struktur des Proteins stehen noch nicht zur Verfügung. Bei bisher publizierten rekombinanten Zytomegalieviren mit mutiertem IE2 Protein konnten die beobachteten Effekte daher nur bedingt auf den Verlust einzelner Funktionen zurückgeführt werden (Heider et al., 2002; Sanchez et al., 2002; White et al., 2004).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte deshalb eine Struktur-Funktionsanalyse des HCMV IE2 Proteins durchgeführt werden. Ziel der Analyse war es, die unterschiedlichen funktionellen Domänen des IE2 Proteins zu definieren und zu untersuchen, inwieweit diese Domänen überlappen oder strukturell unabhängig sind. Dies sollte als Hinführung zur Identifikation diskriminierender Mutationen dienen, die zukünftig im viralen Kontext untersucht werden sollen. Im Fokus der Untersuchungen standen die Zellzyklusarrest-Funktion, die Transaktivierung, sowie die Autorepression und DNA-Bindung. Alle diese Aktivitäten sollten innerhalb des gleichen experimentellen Systems, nämlich der Expression in permissiven Zellen, untersucht werden. Da ein adäquater Assay für die DNA-Bindung noch nicht zur Verfügung stand, musste ein entsprechendes System zunächst etabliert werden.

II. Material und Methoden

1 Allgemeine Materialien

Chemikalien (soweit nicht anders angegeben):

Sigma, Roth, Merck

Lösungen:

PBS:	8,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 3mM KCl
TBS:	10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl
TTBS:	10 mM Tris-Cl (pH 7,6), 9 g/l NaCl, 0,1% Tween 20
TBE:	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 10 mM EDTA
TE:	10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

Geräte:

Zentrifugen:

Tischzentrifuge	MicroMax IEC
Optima TLX Ultracentrifuge	Beckmann
CS15-R Centrifuge, CS-6R Centrifuge	Beckmann
RC- 313 Plus	Sorvall
Spektrophotometer	eppendorf BioPhotometer
Bakterien-Elektroporationstransformator	BioRad Gene Pulser™
Spannungsgeräte	PowerPac 300- BioRad
Lumat LB9501	EG&G Berthold, Bad Wildbad
ELISA-Lesegerät	DYNATECH MR5000
PCR-Cycler	Eppendorf Master Cycler Gradient
	MWG Biotec Omni Gene
LiCor dna sequencer model 4000	MWG Biotech
Geltrockner	Slab Gel Dryer SGD 4050 Savant

2 *Bakterienkultur und Plasmidisolierung*

Materialien:

LB-Medium	(Sambrock et al., 1989) 10 g/l Trypton-Pepton (mit Pankreaseenzymen verdautes Casein, DIFCO), 5 g/l Hefeextrakt (DIFCO), 10 g/l NaCl, 0,1 mg/ml Ampicillin
2YT-Medium	(Sambrock et al., 1989) 16g/l Trypton-Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5g/ NaCl, 0,1 mg/ml Ampicillin
Lösung I	25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 50 mM Glucose
Lösung II	0,2 M NaOH, 1% SDS
Lösung III	5M Kaliumacetat, 10% Essigsäure

Durchführung:

Alle Plasmide wurden in E.coli XL1-blue (Stratagene) propagiert. Durch Elektroporation (Dower et al, 1988) wurde dieser Bakterienstamm initial mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Dabei wurde ein Gene Pulser von der Firma Bio-Rad benutzt und den Anleitungen des Herstellers sowohl bei der Präparation elektrokompenter Bakterien als auch bei der Elektrotransformation genau Folge geleistet. Um sie in Transfektionen einsetzen zu können, wurden alle Plasmide in größerem Maßstab präpariert und durch Zentrifugation in einem CsCl-Dichtegradienten gereinigt. Bei bereits im Labor vorhandenen Plasmiden erfolgte das Beimpfen der Stammkultur mit einer geringen Menge einer Glycerinkultur, während bei Plasmiden, die in eigener Arbeit im Rahmen der IE2-Mutagenese hergestellt wurden, hierfür der Rest einer Mini-Kultur verwendet wurde (siehe 4.). Diese Vorkultur wurde auf dem Warmluftschüttler bei 37°C und 140 Umdrehungen pro Minute (UpM) über Nacht kultiviert und am nächsten Tag 500 µl dieser Vorkultur zum Animpfen der 500 ml Hauptkultur (2YT-Medium) verwendet. Es folgte eine weitere Inkubation für 14 –18 h bei 37° C. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, in 30 ml der Lösung I resuspendiert und durch Vermischen mit 60 ml der Lösung II lysiert. Durch nachfolgendes Vermischen mit 30 ml der eiskalten Lösung III wurde der Grossteil der bakteriellen Proteine und genomischen DNA ausgefällt und durch Zentrifugation abgetrennt. Die im Überstand verbliebenen Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von

0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt und nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 8 ml TE gelöst und dieser Lösung zunächst 8,3 g CsCl und anschließend 0,8 ml einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugesetzt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 3000 g wurden noch einmal unlösliche Bestandteile entfernt und die Lösung dann für mindestens 14 h in einem TLA 100.4-Rotor (Beckmann) bei 234.000 g zentrifugiert. Danach wurde die intakte Plasmid-DNA enthaltende Bande aus dem entstandenen CsCl-Gradienten mittels einer Einmalspritze abgezogen und daraus das Ethidiumbromid durch 4 bis 6-maliges Ausschütteln mit TE-gesättigtem Butanol extrahiert. CsCl- und Butanolrückstände wurden durch zweimalige ethanolische Fällung (0,3 M Natriumazetat/75% Ethanol) entfernt und das DNA Pellet abschließend noch zweimal mit 75% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde schließlich in TE gelöst. Die DNA-Konzentration der Plasmidlösung wurde durch Messung ihrer Absorption bei UV-Licht der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C.

Folgende im Labor bereits vorhandene Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. pSG5-3HA | pSG5-Vektor mit einem Triple-HA-Epitop als Insertion |
| 2. pSG5-CD20 | pSG5-Vektor mit CD20-cDNA (Mensch) als Insertion |
| 3. pSG5-3HA-IE2 | pSG5-Vektor mit kompletter IE2 cDNA und Tripel-HA-Epitop |
| 4. pSG5-3HA-IE2 (1-544) | pSG5-Vektor mit einer verkürzten Form der IE2 cDNA sowie Tripel- HA- Epitop |
| 5. pSG5-3HA-IE2 (1-450) | pSG5-Vektor mit einer verkürzten Form der IE2 cDNA sowie Tripel HA- Epitop |
| 6. pSG5-3HA-IE2 (195-580) | pSG5-Vektor mit einer verkürzten Form der IE2 cDNA sowie Tripel HA- Epitop |

Die Plasmide Nr. 1-6 sind in vorangegangenen Arbeiten im Labor von Prof. Dr. Hagemeier hergestellt worden (Wiebusch und Hagemeier, 1999).

- | | |
|------------|---|
| 7. pHM142 | UL112/113 Promotorkonstrukt, das die Nukleotide -352 bis +37 des UL112/113 Promotors vor einem Luciferase Reportergen enthält; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Stamminger, Institut für Virologie, Erlangen |
| 8. pfosCAT | c-fos Promotor-Reporterkonstrukt, das den murinen c-fos |

-
- Promotor vor dem Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) enthält (Hagemeier et al., 1992)
9. pRR55 MIE Enhancer/Promotor-Konstrukt, das die HCMV AD169 IE1/IE2 Promotor/Enhancer Region zwischen den Nukleotiden – 671 und +52 relativ zum Transkriptionsstart upstream eines CAT Reportergens enthält; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Prösch, Institut für Virologie, Charité
10. pRR55mut wie Nr. 9, jedoch wurde die crs mutiert, so dass dieses Konstrukt von IE2 nicht autoreprimiert werden kann, da die Bindung von IE2 an die crs verhindert wird; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Prösch, Institut für Virologie, Charité
11. pIE1cat MIE Enhancer/Promotorkonstrukt, das die Nukleotide –302 bis +72 des HCMV MIE Promotors vor einem CAT-Reportergen enthält (Shelbourn et al., 1989); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Prösch, Institut für Virologie, Charité
12. pGFP-IE86 IE2-Expressionsplasmid, das die cDNA des IE2 aus dem HCMV-Town-Stamm hinter dem MIE Promotor (mit mutierter crs) enthält. Zusätzlich wird GFP über einen SV40-Promotor exprimiert (Murphy et al., 2000); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Stinski, University of Iowa, USA
13. pGFP-IE86HL IE2-Expressionsplasmid, das die cDNA IE2 aus dem HCMV-Town-Stamm hinter dem MIE Promotor (mit mutierter crs) enthält. Der postulierte Zinkfinger des IE2 ist durch Substitution der Histidine (Pos. 447 und 453) durch Leucine zerstört worden. Zusätzlich wird GFP über einen SV40-Promotor exprimiert (Murphy et al., 2000); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Stinski, University of Iowa, USA

3 Klonierung der IE2-Mutanten

Im Rahmen der Mutationsanalyse wurden verschiedene IE2-Mutanten mittels gerichteter Mutagenese hergestellt, wobei verschiedene Mutagenese-Methoden zum Einsatz kamen.

Für C-terminale Deletionsmutanten wurde die IE2-Sequenz mittels PCR aus dem Konstrukt pSG5-3HA-IE2, das die Wildtyp Sequenz des IE2 Proteins enthält, amplifiziert und über die verwendeten PCR-Oligonukleotide C-terminal an der gewünschten Stelle ein Stopcodon eingefügt.

Materialien:

Qiaquick PCR Purification Kit Qiagen GmbH, Hilden

Qiaquick PCR Gel Extraction Kit Qiagen GmbH, Hilden

Folgende PCR-Oligonukleotide wurden verwendet:

CH 49 IE1/IE2sense: 5'- TATGGATCCATGGAGTCCTCTGCCAAGAG-3'

BamH1-Schnittstelle, IE2-cDNA (codierender Strang ab Codon 1)

IE2-as513StopBglII: 5'-CGTAAGATCTAGACTACAGGGGCAGGCACAGGTTG-3'

BglII-Schnittstelle, IE2-cDNA (Gegenstrang ab Stop-Codon, Pos.513)

IE2-as497StopBglII: 5'-CGTAAGATCTAAGCGTGGATGATCATGTTG-3'

BglII-Schnittstelle, IE2-cDNA (Gegenstrang ab Stop-Codon, Pos.497)

IE2-as482StopBglII: 5'-CGTAAGATCTAGACTATTGGTGGGTGTGCAATT-3'

BglII-Schnittstelle, IE2-cDNA (Gegenstrang ab Stop-Codon, Pos.482)

Durchführung:

Die Starter-Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion in lyophilisierten Zustand bezogen, in H₂O gelöst (Konzentration 0,1nM) und bei -20°C gelagert. Die Durchführung der PCR erfolgte gemäß beschriebenem Protokoll (Sambrock et al., 1989). Nach Beendigung der PCR wurden die PCR-Produkte mithilfe des Qiaquick PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) gereinigt und mit den Restriktionsenzymen BamH1 und BglII geschnitten, indem Hälfte des aufgereinigten PCR-Produkts mit jeweils 1U der beiden Enzyme für 2 h bei 37°C inkubiert wurden. Nach Beendigung des Restriktionsverdaus wurden die Amplifikate durch eine präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und mit dem Qiaquick Gel Extraktion Kit eluiert.

Das so präparierte DNA-Fragment konnte nun mit dem Zielvektor ligiert werden. Der Zielvektor, in diesem Falle pSG5-3HA war für diesen Zweck wie folgt vorbereitet worden: 1 µg der Vektor-DNA wurden mit 3-4 U des Restriktionsenzym BglII durch zweistündige Inkubation bei 37°C im OPA-Reaktionspuffer von Pharmacia (20 µl

Reaktionsvolumen) geschnitten. Danach wurde das Enzym durch Inkubation bei 85°C für 10 min inaktiviert und die Vektor-DNA dephosphoryliert, um ein Religieren des Vektors zu verhindern. Dazu wurde 1 U Alkalische Phosphatase (alkaline Phosphatase, Roche) in 30 µl 1x Dephosphorylierungspuffer dem Restriktionsansatz zugefügt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 65°C. Ein weiteres Mal wurde 1 U der Alkalischen Phosphatase zugefügt und dieselbe Inkubationsabfolge durchlaufen. Dem Reaktionsansatz wurde danach DNA-Probenpuffer zugesetzt und der dephosphorylierte Vektor mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt. Zur Elution der Vektor-DNA wurde ebenfalls der Qiaquick Gel Extraction Kit verwendet und das Protokoll gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

4 Ligation, Transformation und DNA-Minipräparation

Für die Ligation wurden je 4 µl des dephosphorylierten Zielvektors mit 4 µl des aufgereinigten PCR Produkts in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 10 U T4-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Ein Mikroliter des Ligationsansatzes wurde anschließend für die Transformation von E.coli XL-1 Blue verwendet und ein Aliquot des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach Übernacht-Inkubation bei 37 °C wurden die entstandenen Einzelkolonien zum Animpfen einer 2 ml-Schüttelkultur verwendet, die über Nacht bei 37°C und 200 UpM inkubiert wurde. Aus einem Teil dieser Minikultur wurde die Plasmid-DNA nach Methode der alkalischen Lyse aus den Bakterien präpariert, der Rest bei 4°C für eine spätere Verwendung gelagert. Die Bakterienlösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 1 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl der Lösung I (siehe 2.) suspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lösung II bei 0 °C lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 150 µl Lösung III abgestoppt und die dadurch ausgefällten Proteine und genomische DNA durch Zentrifugation abgetrennt. Vierhundert Mikroliter des Überstandes wurden mit 0,8 ml absolutem Ethanol versetzt und nach ca. 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wiederum für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurden noch einmal mit 70% Ethanol gewaschen und das getrocknete DNA Pellet anschliessend in 50 µl TE Puffer resuspendiert. Die DNA wurde in einem analytischen Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese

auf die gewünschte Mutation hin untersucht. Bei positiven Klone wurde der Rest der Minikultur zum Animpfen einer Maxikultur verwendet (siehe 2.).

5 *Gerichtete in vitro Mutagenese nach der Kunkel-Methode*

Die internen Deletions- und Aminosäureaustauschmutanten des IE2 Proteins wurden mittels gerichteter *in vitro* Mutagenese nach der Kunkel-Methode hergestellt.

Bei dieser Methode wird das zu mutierende Plasmid, in diesem Falle pSG5-3HA-IE2, vor der Mutagenese in einem E.coli Stamm (RZ1032) propagiert, der eine Mutation in der dUTPase⁻ (dut⁻) und der Uracil-Glykosilase⁻ (ung⁻) Aktivität trägt. Die dut⁻ Mutation führt zu einem erhöhten dUTP-Spiegel in der Zelle, was zur Folge hat, dass während der DNA Replikation ein gewisser Prozentsatz Uracil anstelle von Thymidin eingebaut wird. Diese Uracil Reste würden normalerweise von der Uracil-Glykosilase entfernt werden, in den ung⁻ Zellen bleiben sie jedoch erhalten. Als Folge davon produzieren dut⁻ ung⁻ E.coli Vektor-DNA, die einen Anteil Uracil-Reste enthält. Da die verwendeten Plasmide einen Replikationsorigin für filamentöse Phagen enthalten, führt die Infektion der E.coli-Zellen mit einem Helferphagen zur Produktion einzelstängiger Plasmid-DNA, die anschließend in einer *in vitro* Mutagenese Reaktion verwendet werden kann. Das Ergebnis einer solchen Mutagenesereaktion ist ein DNA-Hybrid, in dem der nicht-mutierte Strang Uracil-Reste enthält, der mutierte jedoch nicht. Wird ein Aliquot der Mutagenesereaktion in einen ung⁺ E.coli Stamm transformiert, so wird der Uracil-enthaltende nicht-mutierte Strang durch die Uracil-Glycosilase abgebaut, so dass zugunsten des mutierten Stranges selektiert wird.

Materialien:

LB/ Amp-Platten

PEG/Ammoniumacetat 3,5 M Ammoniumazetat, 20% (w/v) Polyethylenglykol
800 (PEG)

Annealing Puffer 500 mM NaCl, 100 mM Tris-pH 8,0, 100 mM MgCl₂ * 6
H₂O, 50 mM DTT; steril filtriert, Lagerung bei -20°C

Ligasepuffer Boehringer Mannheim GmbH

Phenol Roth

Chloroform/Isoamylalkohol Roth
R408-Phagenstammlösung Stratagene

Durchführung:

1. Herstellung einer Helferphagen-Stammlösung

Aus einer Übernachtskultur eines F'-E.coli-Stammes (XL1-blue) werden 100 µl in 10 ml frisches LB-Medium in einem 50 ml Glaskolben gegeben und bei 37°C und 225 rpm so lange inkubiert, bis die OD₆₀₀ ca. 0,2 erreicht (midlog-Phase). Diese Kultur wird dann mit 1 µl der Phagen-Stammlösung angeimpft und weitere 6 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Danach werden die Zellen bei 5000 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand durch einen 0,45 mm Filter mit einer sterilen 10 ml Spritze filtriert und in sterilen Falcon-Röhrchen gesammelt. Diese Falcon-Röhrchen wurden anschließend für 10 min bei 60°C inkubiert, um eventuell noch lebende Bakterien abzutöten. Danach wurde die Lösung aliquotiert und bei 4°C gelagert.

2. Herstellung einzelsträngiger Phagemid-DNA

Der Ausgangsvektor mit der intakten IE2 cDNA (pSG5-IE2-3HA) wurde wie beschrieben in E.coli RZ1032 Zellen transformiert und ein Aliquot der Reaktion auf LB-Amp Platten ausplattiert. Hiervon wurden je 2 Kolonien zum Animpfen von 5 ml LB-Medium verwendet, welches dann bei 37°C und 225 rpm so lange inkubiert, bis die OD₆₀₀ ca. 0,2 erreicht hatte. Die Kultur wurde dann mit 10 µl Phagenstammlösung R408 infiziert und weitere 5-6 h bei 37°C und 250 –265 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur in drei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 11000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Währenddessen wurden je 250 ml 20%-PEG in 3,5 M Ammoniumazetat in drei neue 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde je 1 ml Überstand zu der PEG-Lösung gegeben, die Lösung durch Schütteln gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Phagen DNA auszufällen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 16000 g und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und die Proben ein weiteres Mal für 2 min wie beschrieben zentrifugiert, um noch vorhandenen Überstand entfernen zu können. Die Pellets wurden in jeweils 100 µl TE resuspendiert und die Inhalte der drei Reaktionsgefäße vereinigt. Nun wurden 150 µl Phenol zu dem Ansatz gegeben, auf dem Vortex gemischt und anschließend bei 13200 rpm für 1 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Volumen

Chloroform-Isoamyl-Alkohol (24:1) gemischt, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Azetat und 2 Volumen eiskaltem Ethanol die DNA für 30 min bei -20°C gefällt. Die Lösung wurde anschließend für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt, und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette aspiriert. Das trockene Pellet wurde in 40 μl TE resuspendiert und bei -20°C gelagert. Ein Aliquot der präparierten DNA wurde auf einem 1% igem Agarosegel analysiert, um die Präparation zu überprüfen und die DNA-Konzentration abzuschätzen.

3. Phosphorylierung der Mutageneseprimer

Zur Phosphorylierung der Mutageneseprimer wurden ca. 150 pmol Primer in 1x Ligasepuffer mit 2 μl T4 Polynukleotidkinase (16 U, Boehringer Mannheim) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert und der phosphorylierte Primer bei -20°C gelagert.

Über die verwendeten Oligonukleotide gibt die nachfolgende Tabelle Auskunft.

Tabelle 1: Oligonukleotide für die Mutagenesereaktionen

Name	Sequenz von 5' nach 3'
pm501-508	CACGCTGCCACCCCCGCGGCCGCGGCCGCGGCTGCCAACCTGTGCCTGCCC
pm510-517	GGCGCTCTCAACCTGGCCGCGGCCGCGGCCGCGGCAGCGTTTCCCAAACAGGTC
pm519-526	GATGCAAAAGTTTCCCGCAGCGGCCGCGGCCGCGGCCGCTTCTCCACCAACCAG
pm528-535	GTGCGCATCTTCTCCGCCGCCGCGGCCGCGGCCGCGCTGCCTATCTACGAG
pm537-544	GGGTTTCATGCTGCCTGCCGCCGCGGCCGCGGCCGCGGCCCTACGCCGTGGGG
del 230-249	CCTTCCACCGGCAGCGGCACGCCCTTGGGCCGCGCCCGATG
del 260-279	GGCCCGATGAAGATAGTTCCAAATGCAGCAGTGGCGGAGG
del 290-309	GTGGCGGAGGAGCATCCGTGTGCGGCCATCAGAGCAGCGG
del 330-349	CGCAAGAAGAAGAGCAAACGCTGCACACCCAACGTGCAGAC
del 380-399	CCAATCGCTCTCTTGAGTACTGCAAAACCATGCAGGTGAAC
del 430-449	GAGGTGGATGCGGTGCGGTGTCCCGTGACACATCCACCCGAAG
del 470-489	CGATGCTTGTAACGAAGGCGTCTACCGCAACATGATCATCCAC

4. In vitro Mutagenese

Fünf Mikroliter einzelsträngige Plasmid-DNA-Präparation (ca. 1 µg einzelsträngige Plasmid-DNA) wurden mit 2 µl des Primer-Phosphorylierungsansatzes und 1 µl Annealingpuffer in 10 µl Gesamtvolumen 5 min bei 65°C in einem Wasserbad inkubiert und zur Abkühlung ca. 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Diesem Annealingansatz wurden dann 2 U T4-DNA-Ligase, 2,5 U T4 DNA Polymerase, Ligase Puffer, dNTPs (0,5 mM) sowie ATP (0,5 mM) hinzugefügt und das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert.

5. Selektion gegen den nicht mutierten Strang

Zur Selektion wurde 1 µl des Mutageneseansatzes in kompetente E.coli XL1-blue transformiert. Da dieser Stamm ung⁺ ist, wird der uracilhaltige nichtmutierte Strang spezifisch abgebaut, so dass in der Regel 1/3 bis 2/3 der resultierenden Kolonien ein Plasmid mit der Mutation enthalten. Dementsprechend wurden von 3-5 Kolonien Minikulturen (2 ml-Kulturen) angesetzt und eine Mini-DNA-Präparation durchgeführt. Die DNA wurde dann mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung auf das Vorhandensein der Mutation sowie auf korrekte IE2-Sequenz hin überprüft.

6 *DNA-Sequenzierung*

Materialien:

Sequenzierkit	Thermo Sequenase Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP- Amersham Biosciences RNP2438
Oligonukleotide:	Alle für die Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide enthalten eine wurden von der Firma MWG bezogen und trugen eine Fluoreszenzmarkierung (IRD800) am 5'-Ende.
T7-Oligonukleotid	5'- AATACGACTCACTATAG-3'
SG5-antisense	5'- ACCACAAGTAGGAATGCAG-3'
IE2 sense pos.808	5'- TCGGACTCGGAGAGTGAG-3'
IE2 antisense pos.943	5'- TGCTCTGATGGCCGCAGC-3'

Durchführung:

Alle neu klonierten Plasmide wurden unter Verwendung des Thermo Sequenase-Sequenzierkits von Amersham sequenziert. Hierfür wurden 3 µg template DNA mit 2 µl

des IRD-markierten Oligonukleotids (ungefähr 1 pmol) in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und jeweils 5µl in einer PCR-Reaktion mit jeweils 2µl der A-, C-, G-, oder T-Reagenz eingesetzt. Nach der PCR wurden jeweils 1,2 µl der Reaktion auf ein Sequenziergel aufgetragen. Die Datensammlung und -analyse erfolgte mit dem Li-Cor dna sequencer model 4000 (MWG Biotech) sowie dem Programm Base ImagIR Program v.4.1 (Li-COR). Die Auswertung und der Vergleich der Sequenzen wurde mittels des Programms Dnasis durchgeführt.

7 Zellkultur

Materialien:

DMEM	Gibco-BRL, Katalog-Nr. 61965-026
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Neugeborenen Kälberserum (NKS)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin	Gibco-BRL, Katalog-Nr.
Plastikmaterialien	Greiner bio-one, Falcon, TPP-Switzerland

Folgende adhärenzte Zelllinien wurden verwendet:

U373-MG	humane Astrozytomzelllinie, bezogen von Cell Line Services, Heidelberg
HeLa	humane Adenokarzinomzelllinie, bezogen von AG T.Kloetzel

Durchführung:

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden als adhärenz wachsende Monolayer in DMEM, dem 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und jeweils 5% FKS und NKS zugesetzt worden war, bei 5% CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Passage der Zellen wurde alle drei Tage das Zellmedium entfernt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und dann in einer Trypsin/EDTA-Lösung ca. 3 min bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Plastikuntergrund abgelöst hatten. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt und die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 im Falle der U373-Zellen, bzw. 1:10 bei den HeLa Zellen in frischem Medium verdünnt und auf neue Schalen ausplattiert.

8 *Transfektionen*

Materialien:

Plasmid DNA

CaCl₂ 2,5 M, steril filtriert

2x BBS 50 mM BES, 280 nM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,95

Durchführung:

Plasmid-DNA wurde nach der von Chen und Okayama modifizierten Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode (Chen C. , 1987) in die Zellen transfiziert.

Die Mengenangaben des folgenden Protokolls beziehen sich auf einen Milliliter Medium in den zu transfizierenden Zellkulturschalen.

Insgesamt 2 µg Plasmid-DNA (das jeweilige Verhältnis von Effektor- und Marker- bzw. Reporterplasmid ist in Tab. 2 angegeben) wurde in einem Volumen von 56,25 ml TE-Puffer (0,1x) gemischt. Dieser Lösung wurde nacheinander 6,25 ml der CaCl₂-Lösung und 62,5 ml 2xBBS zugegeben. Zehn bis zwanzig Minuten später wurde die inzwischen trübe Lösung dem Kulturmedium der Zellen hinzugefügt, die ca. 24 h zuvor passagiert (siehe 7.) worden waren. Die Zellen wurden in diesem Transfektionsmedium 14-16 h bei 3% CO₂ inkubiert, bevor dieses wieder entfernt und zurückgebliebenes Präzipitat mit TBS gewaschen wurde. Bis zur Ernte (siehe 9.) weitere 32 h später, wurden die Zellen in frischem Kulturmedium gehalten.

Tabelle 2: Mengenverhältnis von Effektor zu Reporterplasmid im Transfektionsansatz

Art des Assays	Schale (Ø)	Mediumvol.	Effektorplasmid	CD20-bzw. Reporterpl.
Zellzyklus	9 cm	10 ml	16 µg	4 µg
Transaktivierung	6 cm	4 ml	4,6 µg	1,6 µg
Autorepression	6 cm	4 ml	6 µg	2 µg

9 *Zellernte für die Durchflußzytometrie*

Für die Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen in 9 cm Schalen mit je 16 µg IE2 Effektorplasmid und 4 µg CD20 transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Ernte der Zellen für die weitere Verwendung in der Durchflußzytometrie. Hierfür wurde der Kulturüberstand in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, Medienreste durch einmaliges

Waschen mit PBS entfernt und die Zellen dann in einer Trypsin/EDTA -Lösung solange bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Plastikuntergrund ablösten. Mithilfe einer Pasteurpipette wurden die Zellen suspendiert und dann in dem vorgelegten Kulturüberstand aufgenommen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 200 g wurden die Zellen in PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 200 g pelletiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Zellmaterial für die weitere Markierung verwendet und 1/10 des Zellmaterials für eine Zellextraktion abgenommen. Um die CD20 Expression der transient transfizierten Zellen zu messen und somit eine Auskunft über die relative Transfektionsstärke einzelner Zellen zu bekommen, wurden die Zellen mit einem FITC-gekoppelten CD20-spezifischen Antikörper (Klon 2H7, Pharmingen) gefärbt. Hierzu wurden die geernteten Zellen in 50 ml Kulturmedium resuspendiert, welches 0,125 µg des Antikörpers enthielt. In dieser Lösung wurden die Zellen für 30 min bei 0°C inkubiert und dann durch Zugabe von 10 ml PBS/1% FKS und nachfolgende Zentrifugation (5 min bei 200 g) gewaschen. Um parallel zu der FITC-Fluoreszenz den DNA-Gehalt der transfizierten Zellen im Durchflußzytometer bestimmen zu können, mussten die Zellen permeabilisiert und mit Propidiumjodid gefärbt werden. Dazu wurden die Zellen nach der Antikörperfärbung in 1 ml PBS suspendiert und unter ständigem Aufwirbeln mit 3 ml absolutem Ethanol versetzt, welches auf -20°C temperiert war. Dann wurden sie für mindestens 14 h bei 0°C gelagert und anschließend 3 min bei 400 g zentrifugiert. Nach Resuspension in 1 ml PBS und nochmaliger Zentrifugation bei 200 g wurde das Zellpellet je nach Größe in 250 – 500 ml Färbelösung (PBS, 50 µg/ml Propidiumjodid, 100 U/ml Rnase A) aufgenommen und darin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte die durchflußzytometrische Analyse der Zellen mit einem FACScan-Gerät und dem Computerprogramm CellQuest (beides Beckton Dickinson). Zur Überprüfung erfolgte eine zusätzliche Auswertung mit dem Programm Modfit. Gemessen wurde jeweils die FITC-Fluoreszenz als auch das Propidiumjodid-Fluoreszenzsignal, das den DNA-Gehalt angibt. Die Kompensation der bei dieser Zweifarbenanalyse benutzten Fluoreszenzkanäle des Zytometers wurde wie beschrieben durchgeführt (Coligan, 1991). Zusätzlich wurden mittels des Dubletten-diskriminierungsmoduls des Zytometers anhand des Propidiumjodid-Fluoreszenzsignals die aneinanderhaftenden Zellen ausgegrenzt. Wie in der Literatur beschrieben (van den Heuvel und Harlow, 1993) wurden diejenigen der transfizierten Zellen für die DNA-

Analyse verwendet, die ein mindestens 20-fach stärkeres FITC-Signal aufwiesen als die untransfizierte Subpopulation.

10 Zellextraktion zur Immunoblot-Analyse

Nach der Ernte (siehe 9.) wurde ein Aliquot der Zellen in 1x RIPA Puffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5 % Na-deoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris pH 8,0 t) suspendiert und für 30 min bei 0°C lysiert. Anschließend wurden die Lysate 20 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden bei –80°C gelagert. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde mithilfe des DC Protein Assay der Firma Bio-Rad bestimmt, welcher auf der Lowry-Methode (Waterborg und Matthews, 1994) beruht. Dazu wurden 2 ml des Extraktes mit 198 ml H₂O verdünnt, 0,1 ml der kurz zuvor im Verhältnis 2:100 gemischten Reagentien „S“ und „A“ hinzugefügt, und dann mit 0,8 ml Reagenz „B“ gemischt. 10 min später wurde die Lichtabsorption der entstandenen Lösung bei 750 nm im Photometer gemessen. Als Nullkontrolle diente 1x Ripa-Puffer, als Proteinstandard eine BSA-Verdünnungsreihe.

11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Materialien:

DNA-Probenpuffer	MBI Fermentas Loading Buffer Pack
Polyacrylamid	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) – Roth
Laufpuffer	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5% SDS

Durchführung:

Der Nachweis der Expression der transfizierten Proteine erfolgte mithilfe der Verfahren der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli und anschließender Immunoblot-Analyse.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:4 mit dem DNA-Probenpuffer gemischt, 3 min aufgekocht und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde das Mini Protean II-System der Firma Bio-Rad benutzt, wobei das untere Trenngel 8% Polyacrylamid enthielt, sowie 375 mM Tris (pH 8.8) und 0,1% SDS, und das obere Sammelgel 5% Polyacrylamid, 125 mM Tris (pH 6,6) und 0,1% SDS. Die

Polymerisierung wurde durch Zugabe von 0,1% APS und 0,1% TEMED eingeleitet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V so lange, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

12 Immunoblot-Analysen

Materialien:

Membran	PVDF Western Blotting Membranes, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Transferpuffer	20% Methanol, 25 mM Tris, 190 mM Glycin
Milchpulver	SUCOFIN®
Primärantikörper:	
α -HA-Antikörper	monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop Klon 16B12 (Maus, IgG1; 1 mg/ml); Covance
α -IE2-pHM178	polyklonales Antiserum gegen das IE2-Protein (Exon 5), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Stamminger, Institut für Virologie, Erlangen
Sekundärantikörper:	
α -Maus Antikörper	polyklonaler Antikörper (Ziege), Sigma
α -Kaninchen Antikörper	polyklonaler Antikörper (Ziege), Dianova

Die Antikörper waren jeweils in TTBS/6% Trockenmilch gelöst. Diese Lösung wurde durch Zugabe von 0,1% NaN_3 haltbar gemacht, bei 4°C gelagert und mehrfach verwendet.

Detektionskit	Western Lightning PerkinElmer Life Sciences
---------------	---

Durchführung:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran im Tankblotverfahren transferiert. Dazu wurde eine Mini Trans-Blot Transfer Cell der Firma Bio-Rad benutzt, der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 80 V und konnte anhand des vorgefärbten Proteinstandards kontrolliert werden. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in TTBS mit 60 mg/ml gelöstem Trockenmilchpulver für 30 min bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert, um auf diese Weise unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Die Membranen wurden dann mit

dem gegen das zu untersuchende Protein gerichtete Primärantikörper inkubiert, wobei hier in der Regel ein gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper verwendet wurde. Im Falle der Zellextrakte aus der Virusinfektion kam ein IE2-spezifisches Antiserum zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde, danach wurde die Membran viermal für jeweils 10 min in TTBS gewaschen. Anschließend wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper auf gleiche Weise wie beim Primärantikörper durchgeführt. Nach wiederum viermaligem Waschen der Membran mit TTBS erfolgte die Detektion der antikörperbindenden Proteinbanden durch Chemilumineszenznachweis der gleichfalls gebundenen Peroxidaaktivität mittel des Western Lighting Kit von PerkinElmer Life Sciences. Durch kurze Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat) wurde das Ergebnis festgehalten.

13 Proteinbestimmung nach Bradford

Materialien:

Bradford Reagenz	BioRad
BSA	Roth

Durchführung:

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Proteinbestimmung mittels des Bradford Reagenz der Firma Bio-Rad. Hierfür wurden 0,2 ml Bradford Reagenz mit 0,8 ml H₂O gemischt und dem ganzen je 1 µl des Extraktes hinzugegeben. Die Lichtabsorption der entstandenen Lösung bei 595 nm im Photometer gemessen. Als Nullkontrolle diente der jeweilige Lysepuffer bzw. TGA, als Proteinstandard eine BSA-Verdünnungsreihe.

14 CAT-Elisa

Materialien:

CAT-ELISA Kit	Roche
---------------	-------

Durchführung:

Die Bestimmung der CAT Aktivität in den transfizierten Zellen erfolgte mithilfe des CAT ELISA-Kit der Firma Roche, welches nach den Herstellerangaben durchgeführt

wurde. Hierfür wurden die Zellen wie folgt geerntet. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und nach dem letzten Waschgang selbiges gründlich entfernt. Pro 6-cm-Schale wurde nun 1 ml Lysepuffer auf die Schalen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten die Zellextrakte in eine 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 20.000 g und 4°C abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Extrakte wurden in siedendem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Bradford Reagenz (BioRad). Für die Bestimmung der CAT Aktivität im CAT-ELISA wurden gleiche Mengen des Extraktes eingesetzt und der ELISA gemäß den Herstellerangaben durchgeführt, wobei für jede Probe ein Doppelwert ermittelt wurde. Aufgrund der aktivierenden oder reprimierenden Effekte des IE2 Proteins auf zahlreiche Promotoren, wurde auf die Transfektion eines internen Kontrollvektors verzichtet. Stattdessen wurden, wie in der IE2-Literatur üblich, die Transfektionen mindestens dreimal wiederholt, wobei unterschiedliche DNA-Präparationen zum Einsatz kamen (Harel und Alwine, 1998; Hermiston et al., 1990). Die Auswertung des ELISA erfolgte mittels des DYNATECH ELISA-Readers und des Programms Revelation.

15 Luciferase-Assay

Materialien:

Lysepuffer	Reporter Lysis Buffer 5x	Promega
Luciferinlösung	Luciferase Assay Buffer	Promega

Durchführung:

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen 38 h nach Transfektion geerntet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 900 µl PBS auf die Zellen gegeben und diese hierin mittels eines Zellschabers von der Platte abgeschabt. Die Zellen wurden dann mittels Zentrifugation in einer Tischzentrifuge pelletiert und das Pellet in 200 µl des 1x Luciferase-Lysepuffer aufgenommen. Nach einer ca. einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Einfrieren in siedendem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37°C

lysiert. Durch 1-minütige Zentrifugation bei 7000 g wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde sofort für den Luciferase-Assay verwendet.

Pro Probe wurden hierfür 20 µl Extrakt in ein FACS-Röhrchen gegeben und nach Injektion von 50 µl einer 10 mM Luciferinlösung 10 sec im Lumat (LB9501, EG&G Berthold, Bad Wildbach) gemessen, wobei von jeder Probe Doppelwerte bestimmt wurden.

16 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Materialien:

TGA-Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 10% Glycerin, 0,5 mM EDTA, 1mM DTT
BSA	Roth

Durchführung:

1. Präparation der Zellextrakte

Jeweils 24 h nach der Transfektion im Falle der HeLa Zellen und 48 h nach der Transfektion der U373 Zellen, wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und in 5 ml PBS mittels eines Zellschabers geerntet. Die Zellen in PBS wurden in 15 ml Falcons überführt, 5 min bei 200 g abzentrifugiert und das Pellet noch einmal zum Waschen in PBS resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand gründlich entfernt und die Zellen in 3 Volumen TGA-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Präparation der Extrakte mittels Ultraschall (Vibra cell™ sonicator, Sonics & Materials). Die Zellen wurden bei Verwendung einer schmalen Spitze und 80% „output control“ zweimal mit je 3 Impulsen à 1 sec beschallt. Dazwischen wurden die Proben auf Eis gelagert, um ein übermäßiges Erhitzen zu verhindern. Zur Klärung der Extrakte wurden diese für 10 min bei 20.000g zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2. Radioaktive Markierung der Zielsonde

Als Zielsonde diente eine Duplex-DNA-Fragment des Bereichs von -40 bis +17 des MIE Promotors. In dieser Sonde ist also neben der crs auch die TATA Box vorhanden. Folgende Oligonukleotide wurden für die Hybridisierung zur Targetduplex verwendet:

MIEP sense

5'-GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC-3'

MIEP antisense

5'-GATGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCCTAAACGAGCTCTGCTTATATAGACCTCC-3'

MIEP crs mut sense

5'-GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCCTAGGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC-3'

MIEP crs mut antisense

5'-GATGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCCTAacctagGCTCTGCTTATATAGACCTCC-3'

In den crs-mut Oligonukleotiden ist die crs durch Punktmutationen so verändert, dass keine Bindung des IE2-Proteins mehr erfolgen kann. Die Mutation ist hierbei die gleiche wie die in dem verwendeten mutierten MIE Promotorkonstrukt (pRR55mut), das durch IE2 nicht mehr reprimiert wird.

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. Der jeweilige sense-Strang der Duplex trägt am 5'-Ende eine Biotin-Markierung für weitere Anwendungen.

Zur Hybridisierung der Duplex wurden gleiche Mengen des sense und des antisense-Stranges miteinander gemischt, für 5 min bei 95°C inkubiert und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hundert Nanogramm der Duplex wurden dann mit 2 ml Eco Pol Puffer (New England Biolabs (NEB)), 0,5 mM dNTP-Mix, 2,5 U Klenow (NEB) und 20 µCi of [α -³²P]dATP für 30 min bei 37° C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms schloss sich eine weitere Inkubation für 5 min bei 65 °C an. Um nicht-eingebaute Nukleotide zu entfernen, wurde der Markierungsansatz über eine Nick-Säule aufgereinigt, wobei dieser mit 30 µl TE auf 50 µl aufgefüllt und dann auf eine zuvor mit TE equilibrierte Nick-Säule gegeben wurde. Nach einmaligem Waschen mit 0,4 ml TE-Puffer wurden 0,4 ml TE auf die Säule gegeben und der Durchfluß als Sonde verwendet. Die markierte Sonde wurde bei -20°C gelagert.

3. Bindungsansatz

In einem Gesamtvolumen von je 20 µl pro Ansatz wurden 20 µg Protein mit in TE-Puffer mit 3 µg/µl BSA, 5% Glycerin, 1mM MgCl₂, 12,5 ng/µl poly(dA-dT)·(dA-dT) und 5 ng/µl denaturierter, sonizierter Heringssperm DNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 µl radioaktiv markierter Zielduplex (~20.000 cpm, ca. 50 fmol) und eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur

für 10 min. Nach der Bindungsreaktion wurden je 5 µl eines Ansatzes auf ein 4%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und für 1,5 h bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf getrocknet und ein Kodak X-Omat-Film (Kodak X-OmatTM, Sigma, Deisenhofen) belichtet. Nach einer in der Regel 24-stündigen Exposition bei –80°C erfolgte die Auswertung mittels Autoradiographie.

Für die Supershift-Experimente wurde dem ersten Inkubationsansatz jeweils 1 µl (0,5-1 µg) der folgenden Antikörper hinzugefügt:

α-IE Antikörper	monoklonaler Antikörper gerichtet gegen das Exon2 des IE2-Proteins, Klon E13, ARGENE Biosoft (720 µg/ml)
α-HA Antikörper	monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop Klon 16B12, Covance (1mg/ml)
α-IE2-Antiserum	polyklonales Antiserum gegen das IE2-Protein (Exon 5), Konzentration unbekannt, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Stamminger, Institut für Virologie, Erlangen
α-BrdU-Antikörper	monoklonaler Antikörper gegen Bromdeoxyuridin (BrdU) Klon 3D4, Pharmingen, (0,5 mg/ml)
α-CD20 Antikörper	monoklonaler Antikörper gegen den CD20-Oberflächenmarker Klon 2H7, Pharmingen, (0,5 mg/ml)

Für die Konkurrenzexperimente mit nicht-markierter spezifischer Konkurrent-DNA wurde dem Reaktionsgemisch gleichzeitig mit Zugabe der radioaktiv markierten Zielsequenz ein 1-, 5-, 10-, 50- oder 100-facher Überschuss der nicht markierten wt bzw. mutierten Zielsequenz zugegeben. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels eines *Fluorescent Image Analyzer* (Fuji, FLH-3000 Series) und des Programms *Aida Image Analyzer v.3.11*.

III. Ergebnisse

Zur Durchführung der IE2-Struktur-Funktionsanalyse wurde die Aktivität verschiedener IE2-Mutanten im Vergleich zum Wildtypprotein untersucht. Im ersten Teil der Arbeit standen hierbei der Zellzyklusarrest, die Transaktivierungsfähigkeit und die Autoregulation im Mittelpunkt, wobei hauptsächlich bereits etablierte experimentelle Assays zum Einsatz kamen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Untersuchungen auf die DNA-Bindung des IE2-Proteins ausgedehnt. Da ein adäquater DNA-Bindungsassay hier nicht zur Verfügung stand, musste dieser zunächst etabliert werden.

1 Experimentelles System - Aktivitäten des Wildtyp IE2-Proteins

Sämtliche Experimente wurden in HCMV-permissiven U373-Zellen durchgeführt. Diese von einem Astrozytom abstammende Zelllinie gehört neben primären Fibroblasten zu den wenigen bekannten Zelllinien, die permissiv für HCMV sind (Jault 1994, Poland 1990). Aufgrund der bereits beschriebenen Schwierigkeiten, IE2 stabil in Zellen zu exprimieren, wurde auf ein transientes Transfektionssystem zurückgegriffen. Die hierbei verwendete IE2-cDNA entstammt dem HCMV-Stamm AD169.

Abbildung 4 zeigt die Aktivitäten des entsprechenden Proteins in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsassays. Wird IE2 transient in U373-Zellen exprimiert, so führt dies zu einem Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang. Ein derartiger Arrest ist in verschiedenen Zellen und experimentellen Systemen demonstriert worden (Kronschnabl et al., 2002; Murphy et al., 2000; Noris et al., 2002; Wiebusch und Hagemeyer, 1999; Wiebusch und Hagemeyer, 2001). In BrdU-Einbau-Experimenten, die den Nachweis neu-synthetisierter DNA erlauben, beobachtet man bei den IE2-transfizierten Zellen einen Anstieg der Population in der sehr frühen S-Phase (Wiebusch und Hagemeyer, 2001). Wird der DNA-Gehalt der Zellen hingegen mittels Propidiumjodidfärbung bestimmt, so reicht die Auflösung des Signals in der FACS-Analyse nicht aus, um zwischen den Zellen der späten G1-Phase und der frühen S-Phase zu unterscheiden. Daher beobachtet man nach IE2-Transfektion einen Anstieg des G1-Peaks, da in diesem auch die Zellen der frühen S-Phase enthalten sind. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Zellzyklusanalysen mittels Propidiumjodidfärbung durchgeführt, da diese Methode präzise genug ist, wenn lediglich die Fähigkeit zur Induktion eines Zellzyklusarrests untersucht und zwischen aktiven und inaktiven Mutanten unterschieden werden soll.

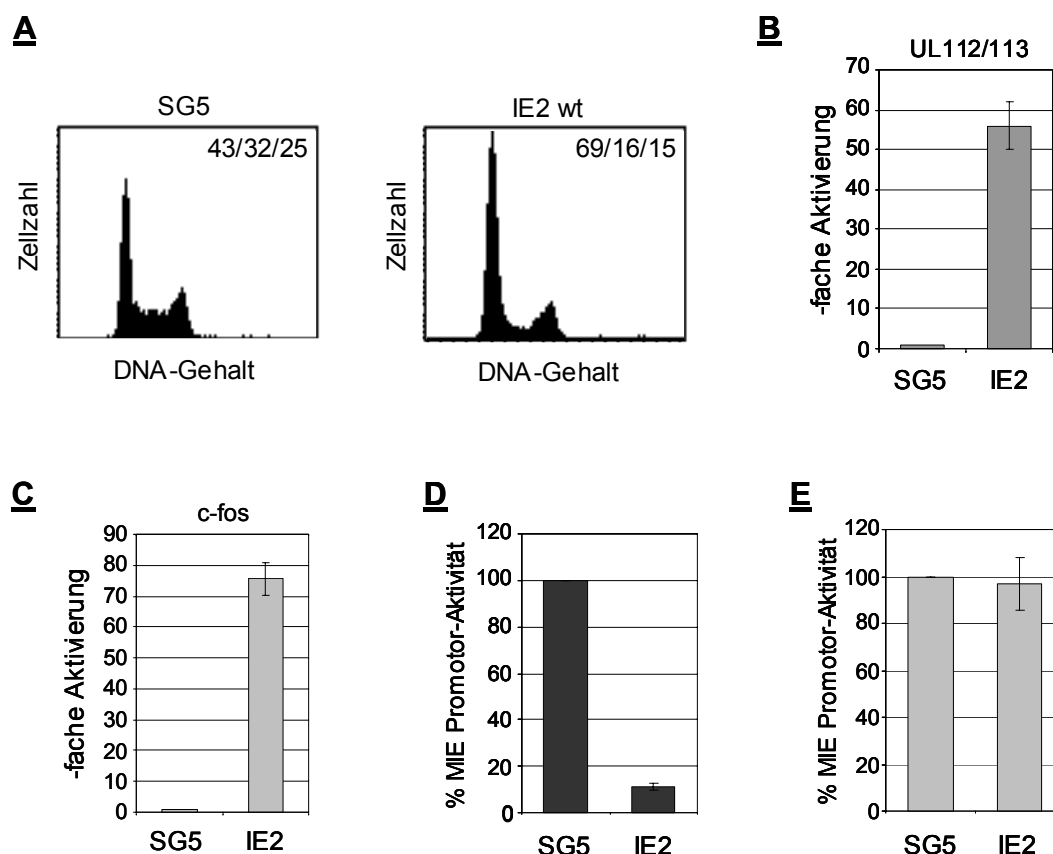


Abb. 4: Aktivitäten des HCMV IE2 Proteins

(A) Zellzyklusarrest. U373-Zellen wurden mit dem leeren Kontrollvektor (pSG5-3HA) oder dem IE2-Expressionsvektor (pSG5-3HA-IE2) transfiziert und 48 h nach Transfektion geerntet. Die Zellzyklusverteilung der transfizierten-Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie und mithilfe der CellQuest Software ermittelt. In den Histogrammen ist der prozentuale Anteil der Zellen in der G1-, S- und G2-Phase angegeben. Der Arrest in IE2-transfizierten Zellen wird in einer solchen Darstellung deutlich im Anstieg des G1-Peaks (hier von 43% in SG5 auf 69% bei IE2). (B) Transaktivierung des UL112/113 Promotors. Zusammen mit dem IE2- bzw. SG5-Expressionsvektor wurden die Zellen mit einem UL112/113-Promotorkonstrukt (pHM142) transfiziert, dem als Reporter das Luciferasegen nachgeschaltet ist. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Luciferaseaktivität bestimmt und so die Aktivierung des Promotors ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 verschiedenen Transfektionen, wobei unterschiedliche DNA Präparationen zum Einsatz kamen. (C) Transaktivierung des c-fos- Promotors. Zusammen mit dem IE2- bzw. SG5-Expressionsvektor wurden die Zellen mit einem c-fos-Promotorkonstrukt (pfosCAT) transfiziert, dem als Reporter das Chloramphenicol-acetyltransferase (CAT)-Gen nachgeschaltet ist. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität als Maß für die Promotoraktivierung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 verschiedenen Transfektionen. (D) Autorepression des Major-Immediate-Early-(MIE-) Promotors. Zusammen mit dem IE2- bzw. pSG5-Expressionsvektor wurden die Zellen mit einem MIE-Promotorkonstrukt (pRR55) transfiziert, dem als Reporter das CAT-Gen nachgeschaltet war. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die relative Promotoraktivität im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen (SG5). Transfektionen wurden viermal

wiederholt, wobei unterschiedliche DNA-Präparationen zum Einsatz kamen. (E) Autorepression des MIE-Promotors bei mutierter *crs*. U373-Zellen wurden wie unter (D) beschrieben mit einem MIE Promotorkonstrukt (pRR55mut) transfiziert, bei dem die *crs* so mutiert ist, dass eine Bindung des IE2-Proteins nicht mehr möglich ist.

Abbildung 4A zeigt ein typisches Histogramm einer FACS-Analyse IE2- bzw. kontroll-transfizierter Zellen. Bei Transfektion des leeren Kontrollvektors pSG5, sind 43% der transfizierten Zellen dem G1-Peak zuzuordnen, der die Zellen der G1 und der frühen S-Phase enthält. In den IE2-transfizierten Zellen steigt der Anteil der Zellen im G1-Peak aufgrund des Anstiegs der Zellen in der frühen S-Phase 69% an. Der Prozentsatz der Zellen innerhalb des G1-Peaks ist demnach um 60 % angestiegen. Um verschiedene IE2 Mutanten in ihrer Zellzyklusarrestaktivität mit dem Wildtyp Protein vergleichen zu können, wurde der durch das Wildtyp IE2-Protein induzierte Anstieg im G1-Peak als 100 % Wildtyp-Aktivität definiert und die Aktivität der Mutanten entsprechend berechnet.

Die Transaktivierungsfähigkeit wurde mit Hilfe des frühen HCMV-Promotors UL112/113 untersucht (siehe Abb.4B). Wie bereits in der Einleitung erläutert, wird dieser Promotor durch das IE2-Protein sowohl über eine ATF/CREB- als auch über mehrere IE2-Bindungsstellen aktiviert (Arlt et al., 1994; Lang et al., 1995; Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1994).

Das von uns verwendete UL112/113 Promotorkonstrukt, pHM142, enthält die Nukleotide -352 bis +37 des UL112/113 Promotors, dem das Luciferasegen als Reporter nachgeschaltet ist. Dieses Konstrukt enthält sowohl die beschriebenen IE2- als auch die ATF/CREB- Bindungsstelle. Wird es zusammen mit einem IE2 Expressionsplasmid in die U373 Zellen transfiziert, so ist im Luciferaseassay eine 50-bis 60-fache Induktion des Promotors im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (Abb.4B) zu beobachten. Um die IE2 Mutanten in ihrer Aktivität mit dem Wildtyp Protein vergleichen zu können, wurde eine solche, durch den Wildtyp vermittelte Aktivierung des Promotors als 100 % Wildtypaktivität definiert und die Aktivitäten der Mutanten entsprechend berechnet. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass das IE2-Protein auf verschiedenste Weise zur Promotoraktivierung führen kann, wurde die Transaktivierung eines weiteren Promotors getestet. Verwendet wurde hierfür der zelluläre *c-fos* Promotor, dessen Transaktivierung über Interaktionen des IE2-Proteins mit basalen Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Das eingesetzte Promotorkonstrukt

(pfosCAT) enthält den murinen c-fos-Promotor, dem das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) als Reporter nachgeschaltet ist. Bei einer Kotransfektion zusammen mit einem IE2-Expressionsplasmid ist eine ca. 70-fache Aktivierung des Promotors durch das IE2-Protein zu beobachten (Abb. 4C)

Die Fähigkeit zur Repression des MIE Promotor/Enhancer wurde mithilfe eines Reporterkonstrukts (pRR55) bestimmt, welches die IE1/IE2 Promotor/Enhancer Region des HCMV AD169 enthält, und zwar den Bereich zwischen Position –671 und +52 relativ zur Transkriptionsstartstelle. Diesem Promotor ist ebenfalls das CAT-Gen als Reporter nachgeschaltet. Wird dieses Konstrukt zusammen mit dem leeren Kontrollvektor pSG5 in U373-Zellen transfiziert, so zeigt der MIE Promotor eine hohe Basalaktivität (Abb.4D). Eine Kotransfektion mit einem IE2-Expressionsvektor jedoch führt zu einer ausgeprägten Repression. Wie in Abb.4D dargestellt, wurde die Aktivität des Promotors in kontroll-transfizierten Zellen als 100 % Promotoraktivität definiert und dies als Referenzwert verwendet. In Anwesenheit des IE2-Proteins sinkt diese Aktivität durch die Autorepression auf nur noch 10–20% ab.

Dass die in den IE2-transfizierten Zellen beobachtete Repression des MIE Promotors auf die Bindung des IE2-Proteins an die crs zurückzuführen ist, zeigt Abbildung 4E. Hier wurde ein Promotorkonstrukt verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Prösch, Institut für Virologie, Charité, Berlin), das dem pRR55 entspricht, bei dem jedoch die crs mutiert ist, so dass eine Bindung des IE2-Proteins nicht mehr möglich ist. Hier bleibt die Promotoraktivität nahezu unverändert.

2 *Struktur-Funktionsanalyse des IE2-Proteins*

Wie bereits gezeigt werden konnte, spielt der C-Terminus des IE2-Proteins auch für den Zellzyklusarrest eine wichtige Rolle, da seine Deletion bis zur Aminosäure (AS) 450 (1-450) zu einem Aktivitätsverlust führt. Im Gegensatz dazu ist eine IE2-Mutante, bei der lediglich die letzten 36 AS deletiert wurden, noch in der Lage, einen Zellzyklusarrest zu induzieren (Wiebusch und Hagemeier, 1999). Um genauer zu definieren, wo zwischen AS 450 und 544 die Grenze dieser zellzyklusregulatorischen Domäne liegt, wurde dieser Bereich mittels C-terminaler Deletionsmutanten weiter untersucht. Diese Mutanten sind in Abbildung 5A schematisch dargestellt, ihre Expressionslevel zeigt Abb. 5B. Die Aktivität dieser Mutanten bezüglich der Induktion eines Zellzyklusarrests

wurde relativ zum Wildtypprotein bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5C dargestellt.

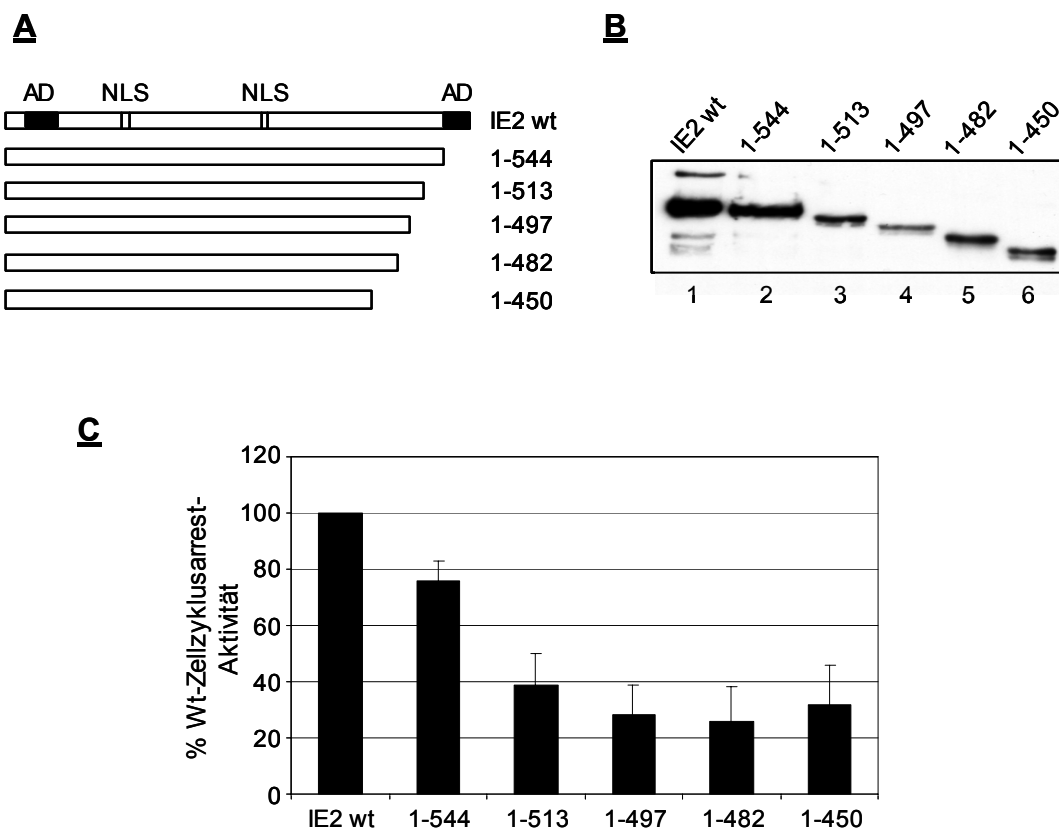


Abb. 5: Einfluss C-terminaler Sequenzen auf die Zellzyklusarrest-Aktivität des IE2 Proteins.

(A) Schematische Darstellung der Deletionsmutanten. (B) U373 Zellen wurden mit den jeweiligen Deletionskonstrukten transfiziert und 48h später geerntet. Ein Aliquot der Zellen wurde für die Präparation von Zellextrakten verwendet, der Rest für die durchflußzytometrische Analyse. Zur Bestimmung der Expressionslevel wurden gleiche Proteinmengen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Menge des IE2 Proteins durch Immunoblot-Analyse mittels eines gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpers nachgewiesen (C) Relative Aktivität der IE2-Mutanten bezüglich Induktion eines Zellzyklusarrests im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Die Zellzyklusverteilung der transfizierten Zellen wurde wie beschrieben mittels FACS-Analyse ermittelt und der prozentuale Anstieg des G1-Peaks als Maß für den Zellzyklusarrest bestimmt. Der bei dem wt IE2-Protein beobachtete Effekt wurde als 100 % wt-Aktivität definiert und die Aktivität der Mutanten relativ dazu bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis aus mindestens 3 unabhängigen Transfektionen sowie die Standardabweichung.

Die Mutante 1-544 führte in den transfizierten Zellen zu einen Zellzyklusarrest, ihre Aktivität lag bei ca. 80 % des Wildtypproteins. Dem gegenüber führte eine weitere Deletion um 30 Aminosäuren zu einem deutlichen Funktionsverlust. Die Mutante 1-513 weist nur noch 40% der Wildtyp-Aktivität auf. Eine weitere Verkürzung des Proteins hat nur noch geringe Effekte. Die Aktivität der restlichen Mutanten liegt bei ca. 30 % des Wildtyps. Aufgrund der Limitierungen des Assays wurde diese Restaktivität als vernachlässigbar und die Mutanten dementsprechend als inaktiv eingestuft.

Bei den Expressionsleveln der Mutanten fallen teilweise Schwankungen im Vergleich zum Wildtyp auf. Diese sind jedoch nicht für die beobachteten Funktionsverluste verantwortlich, da in voran gegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass auch bei geringeren Expressionsleveln die IE2-Proteinmenge nicht limitierend ist (Wiebusch, 2001). Expressionsschwankungen dieser Art wurden zudem auch bei anderen Mutanten beobachtet, (siehe Abb. 7 B, del430 versus Wildtyp), ohne dass sie mit einem Funktionsverlust assoziiert waren.

Daher ist davon auszugehen, dass vor allem die Sequenzen zwischen Aminosäure 497 und 544 eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung des Zellzyklusarrests spielen, wobei der größte Funktionsverlust zwischen den Mutanten 1-543 und 1- 513 zu beobachten war.

Durch den Verlust der C-terminalen aziden Aktivierungsdomäne ist bereits die Mutante mit der kleinsten Deletion, 1-543, transkriptionell inaktiv (Pizzorno et al., 1991; Wiebusch und Hagemeier, 1999). Zudem ist sie nicht mehr in der Lage, den MIE Promoter zu reprimieren (Hermiston et al., 1990; Stenberg et al., 1990). Daher ist davon auszugehen, dass auch die anderen nächst kürzeren C-terminalen Deletionsmutanten inaktiv in Bezug auf Transaktivierung und Autorepression sind, weshalb von ihrer weiteren Analyse abgesehen wurde. Der äußerste C-Terminus enthält demzufolge wichtige Sequenzen für die Transaktivierung und die Autoregulation, während die Zellzyklusarrestfunktion durch eine Deletion dieser Sequenzen nicht wesentlich beeinträchtigt wird. In diesem Bereich des Proteins ist somit zumindest die zellzyklusregulatorische Domäne von den anderen beiden klar abzugrenzen. Unklar ist jedoch, wie weit sich die für die Transaktivierung und Autoregulation benötigten Domänen in Richtung N-terminal der Aminosäure 544 erstrecken.

Um zu untersuchen, ob in dem Bereich zwischen AS 497 und 544 eine Trennung der verschiedenen Aktivitäten möglich ist, wurden kleinere Manipulationen vorgenommen. Hierfür wurden jeweils 7 aufeinanderfolgende Aminosäuren durch Alanine ersetzt. In diesen Mutanten bleibt die C-terminale Aktivierungsdomäne intakt, so dass potentiell die Möglichkeit gegeben ist, dass sie sowohl transaktivieren als auch autoreprimieren können.

Die Mutanten und die Position der Aminosäure-Austausche sind schematisch in Abbildung 6A dargestellt. Angegeben in der Bezeichnung der Mutanten ist jeweils die erste Aminosäure, die durch Alanin ersetzt wurde, bei der Mutante pm501 sind dies demnach die Aminosäure 501-507. Wie in Abbildung 6B zu sehen, zeigen die Mutanten dem Wildtyp vergleichbare Expressionslevel.

In Abbildung 6C ist die relative Zellzyklusarrestaktivität der Mutanten dargestellt. Alle Mutanten zeigen hier einen deutlichen Funktionsverlust. Ihre Aktivität liegt im Durchschnitt bei 50% des Wildtyps, sie besitzen demnach noch eine geringe Restaktivität. Bezüglich der Transaktivierung zeigen ebenfalls alle Mutanten das gleiche Bild (Abb. 6D). Trotz der Anwesenheit der Aktivierungsdomäne ist die Transaktivierungsfähigkeit durch die relativ kleinen Aminosäureaustausche gänzlich verloren gegangen. Wie Abbildung 6E zeigt, ist auch die Fähigkeit zur Autorepression des MIE Promotors durch die Mutationen stark beeinträchtigt worden. In IE2-transfizierten Zellen sinkt die Promotoraktivität durch die Repression des IE2-Proteins auf 10-20%. Bei den Mutanten hingegen ist keine ausgeprägte Repression des Promotors zu erkennen, die Aktivität des Promotors liegt bei 70-80%.

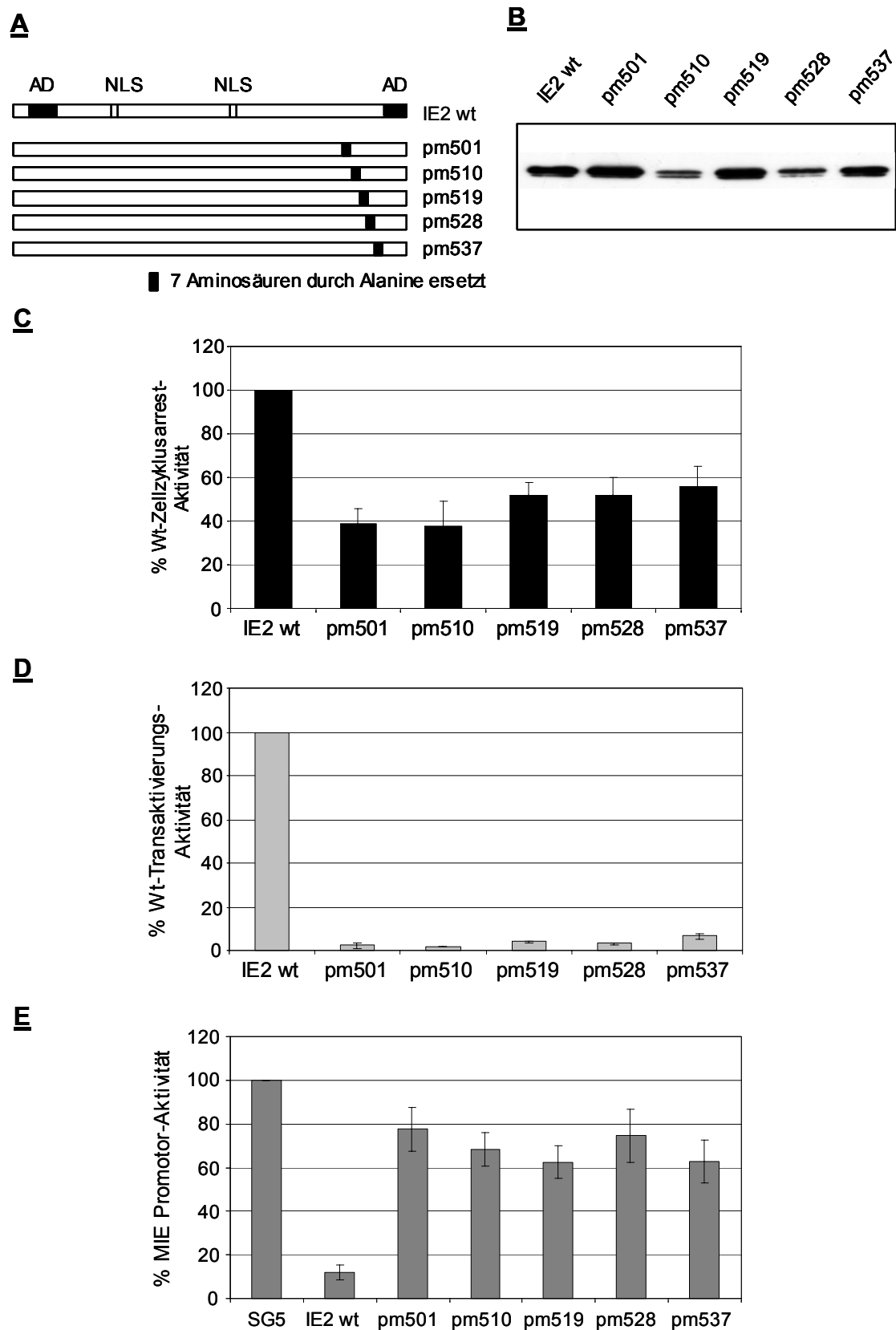


Abb. 6: Überlappung regulatorischer Domänen im C-Terminus des IE2-Proteins: Zellzyklusarrest, Transaktivierung und Autorepression.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Mutanten. Jeweils 7 aufeinanderfolgende Aminosäuren

wurden durch Alanine ersetzt. Angegeben ist die Position der ersten Aminosäure an, die ausgetauscht wurde. (B) Expressionslevel der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Immunoblotanalyse, siehe Abb. 5) (C) Aktivität der Mutanten bezüglich Zellzyklusarrestinduktion. Zur Ermittlung der Zellzyklusarrest-Aktivität wurde wie unter Abb.5 vorgegangen. (D) Transaktivierung des UL112_/113 Promotors. Zur Bestimmung der Transaktivierungsaktivität wurden U373-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden zusammen mit dem UL112/113-Promotor-Reporterkonstrukt transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität in den Zellextrakten gemessen. Die Induktion des Promotors, die in wt IE2 transfizierten Zellen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Zellen ermittelt wurde (in der Regel 50 –60 fach, Vergleich Abb. 4B) wurde als 100% Wt-Aktivität definiert und die Aktivität der Mutanten relativ dazu bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. (E) Autorepression des MIE Promotors durch das wt IE2 Protein und die AS-Austauschmutanten. U373 Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden zusammen mit dem MIE-Promotor-Reporterkonstrukt transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität in den Zellextrakten gemessen. Als Bezugswert diente die Basalaktivität des Promotors in kontroll-transfizierten Zellen (SG5). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Die vorgenommenen Aminosäureaustausche haben in Hinblick auf alle untersuchten Aktivitäten zu einem deutlichen Funktionsverlust geführt. Zwischen den einzelnen Mutationen konnten keine signifikanten Unterschiede in ihren Effekten beobachtet werden. Die C-terminalen Sequenzen zwischen AS 501 und 544 scheinen demnach für die Funktionalität des IE2-Proteins eine wichtige Rolle zu spielen und repräsentieren einen Bereich, in dem, anders als im äußersten C-Terminus, die regulatorischen Proteindomänen überlappen. Unterschiede waren lediglich im Ausmaß des Funktionsverlustes festzustellen. Besonders auffällig ist hier der Gegensatz zwischen dem absoluten Funktionsausfall bei der Transaktivierung und der residualen Aktivität bei der Induktion eines Zellzyklusarrests. Dies könnte darauf hindeuten, dass Aminosäuren außerhalb des Bereichs zwischen Aminosäure 501 und 544 zur Zellzyklusarrestaktivität mit beitragen, die bei Verlust des C-Terminus geringe Restaktivität vermitteln können. Im Gegensatz dazu sind die C-terminalen Aminosäuren für die Transaktivierung essentiell und kann ein Verlust nicht durch andere Bereiche des Proteins kompensiert werden.

Dort, wo die funktionellen Domänen im C-Terminus des Proteins überlappen, scheinen sie Teil einer komplexen, regulatorischen Domäne zu sein. Die C-terminale Grenze dieser Domäne wird markiert durch die Mutante 1-544, da sie zwar nicht mehr transaktiviert und autoreguliert, aber noch in der Lage ist, einen Zellzyklusarrest zu

induzieren. Unklar ist jedoch noch, wo die N-terminale Grenze dieser Domäne liegt. Um dies zu untersuchen, wurde die Mutationsanalyse auf den N-terminalen Bereich des Proteins ausgedehnt. Verwendet wurden hierfür interne Deletionsmutanten, da in ihnen sowohl die N-terminale Aktivierungsdomäne als auch mindestens eine NLS erhalten bleiben konnte. In früheren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die N-terminalen Aminosäuren 1-195 weder für die Induktion eines Zellzyklusarrests (Wiebusch und Hagemeyer, 1999), noch für die Autoregulation (Pizzorno et al., 1991) benötigt werden. Aus diesem Grunde konzentrierte sich die Analyse auf den Bereich zwischen Aminosäure 200 bis 470, wobei jeweils 20 Aminosäuren deletiert wurden. Eine Schema der verschiedenen Mutanten ist in Abbildung 7A dargestellt, Abbildung 7B zeigt ihre Expressionslevel. Die Mutanten del230 und del260 zeigen im Vergleich zum Wildtyp und den übrigen Mutanten ein verändertes Laufverhalten im Gel. Hier sind Teile des Proteins deletiert worden, die posttranslationalen Modifikationen unterworfen sind. Innerhalb dieser Region sind bereits mehrere Phosphorylierungsstellen identifiziert worden (Harel und Alwine, 1998). Eine Mutation oder Deletion solcher Phosphorylierungsstellen kann nicht nur den Phosphorylierungsgrad des Proteins, sondern auch seine Konformation beeinflussen. Dass dies eine Veränderung des Laufverhaltens im Gel verursachen kann, ist bereits für ähnliche IE2-Mutanten beschrieben worden (Harel und Alwine, 1998; Sommer et al., 1994).

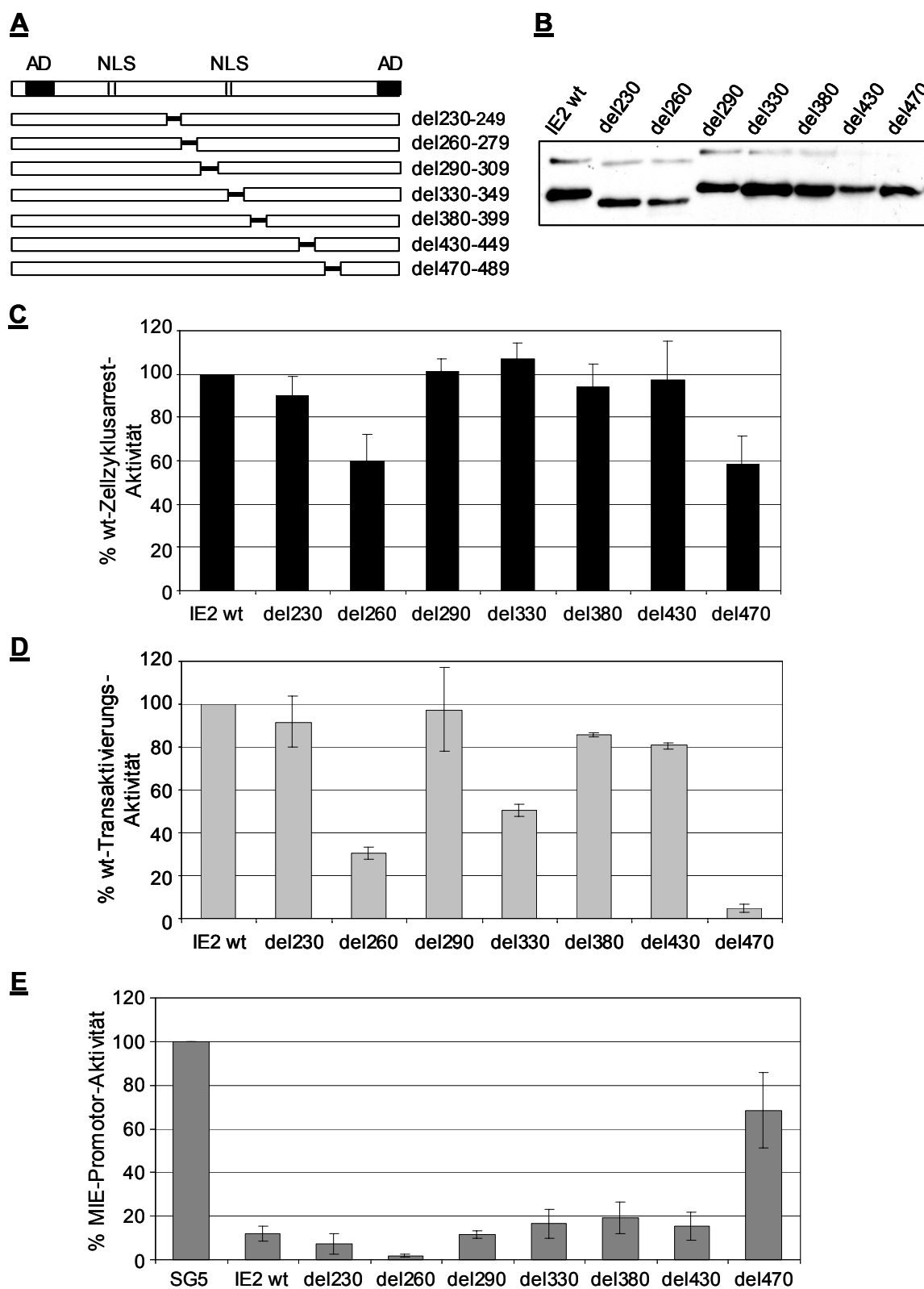


Abb. 7: Einfluss N-terminaler Sequenzen auf den Zellzyklusarrest, die Transaktivierung sowie die Autorepression.

(A) Schematische Darstellung der internen Deletionsmutanten. Jeweils 20 Aminosäuren wurden mittels gerichteter Mutagenese deletiert. Angegeben im Namen der Mutante ist jeweils die erste Aminosäure, die deletiert wurde. (B) Wie in Abb. 4 und 5 angegeben, wurden Zellextrakte hergestellt und die Expression

der IE2-Mutanten im Vergleich zum wt-Protein bestimmt. (C) Aktivität der Mutanten im Vergleich zum wt-Protein bezüglich Zellzyklusarrestinduktion. Zur Durchführung siehe Abb. 4A. (D) Transaktivierung des UL112/113 Promotors durch das IE2-Protein und die Mutanten. Zur Durchführung siehe Abb. 4 B. (E) Autorepression des MIE Promotors durch das wt-IE2 Protein und die internen Deletionsmutanten. Zur Durchführung siehe Abbildung 4D.

Untersucht man die Deletionsmutanten auf ihre Funktionsfähigkeit bezüglich der drei Aktivitäten und vergleicht dies mit dem Wildtyp-Protein (Abb. 7C - E), so fällt zunächst auf, dass es keine großen Funktionsverluste gibt. Hinsichtlich eines Zellzyklusarrests (Abb. 7C) erreichen alle Mutanten Wildtypaktivität, bis auf zwei Ausnahmen. Die Mutante del260 und die Mutante del470 erreichen nur ca. 60% des Wildtypproteins. Diese beiden Mutanten zeigen auch in Bezug auf die Transaktivierung (Abb. 7D) einen Funktionsverlust. Im Gegensatz zu der Mutante del470, die gänzlich inaktiv ist, besitzt die Mutante del260 jedoch noch eine Restaktivität von 30%. Eine weitere Mutante, del330, zeigt ebenfalls einen ca. 50%igen Aktivitätsverlust im Hinblick auf die Transaktivierung, während ihre Zellzyklusarrestaktivität bei der des Wildtyps liegt. Bei allen anderen Mutanten ist die Transaktivierungsfähigkeit nicht wesentlich beeinflusst. In Abbildung 7E ist die Autorepression des MIE Promotors dargestellt. Hier zeigen alle dem Wildtyp vergleichbare Aktivitäten. Einzige Ausnahme ist wiederum die Mutante del470, da bei ihr die Promotoraktivität bei ca. 70 % liegt. Insgesamt zeigt diese Mutante ein Verhalten, wie es auch bei den C-terminalen Austauschmutanten beobachtet wurde. Sie ist eingeschränkt in ihrer Fähigkeit, einen Zellzyklusarrest zu induzieren und inaktiv in Bezug auf Transaktivierung und Autorepression. Die in ihr deletierten Sequenzen (AS 470-489) scheinen demnach Teil der C-terminalen regulatorischen Domäne zu sein. Im Gegensatz dazu ist die Mutante del430 in allen Funktionen aktiv. Die in ihr deletierten Sequenzen werden für die Funktionalität nicht benötigt. Das bedeutet, dass diese Mutation außerhalb der C-terminalen regulatorischen Domäne liegen muss und vielmehr deren N-terminale Grenze markiert. Die anderen beiden Mutanten, bei denen Einschränkungen in der Funktionalität beobachtet wurden, liegen damit ebenfalls außerhalb der C-terminalen Domäne. Sie unterscheiden sich von der Mutante del470 darin, dass mindestens eine der untersuchten Funktionen trotz Mutation unverändert bleibt. Damit markieren diese beiden Mutanten Sequenzen im Protein, die nur für bestimmte Funktionen, nämlich Transaktivierung und Zellzyklusarrest, benötigt werden, während sie für die Autoregulation entbehrlich sind.

Wie in der Einleitung erläutert, kann IE2 auf verschiedene Art und Weise Promotoren transaktivieren. Während die Transaktivierung bestimmter heterologer Promotoren durch IE2 nur von der Anwesenheit der TATA-Box abhängt, ist in HCMV Promotoren die Interaktion mit Promotor-spezifischen Transkriptionsfaktoren sowie die direkte Bindung von IE2 an die DNA von größerer Bedeutung. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde die Transaktivierungsfähigkeit der IE2 Mutanten zusätzlich auch an dem heterologen c-fos Promotor überprüft, bei dem für die Transaktivierung lediglich basale Promotorsequenzen benötigt wird. Hier geht man davon aus, dass die Transaktivierung über Interaktion des IE2-Proteins mit basalen Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Hagemeier et al., 1992; Lukac et al., 1994). Bei einer Kotransfektion dieses Konstrukts mit einem IE2-Expressionsplasmid ist in U373-Zellen in der Regel eine ca. 70-fache Induktion des Promotors im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen zu beobachten (siehe Abb. 4C). Wiederum wurde die Aktivität der Mutanten relativ zum Wildtyp-Protein bestimmt. Abbildung 8 zeigt die Transaktivierungsfähigkeit der Mutanten auf dem c-fos und dem UL112/113 Promotor. Wie man sieht, gibt es trotz der unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Promotoren. Lediglich die Mutante del260 ist auf dem c-fos Promotors noch etwas schwächer als auf dem UL112/113 Promotor, während es bei der Mutante del330 genau umgekehrt ist.

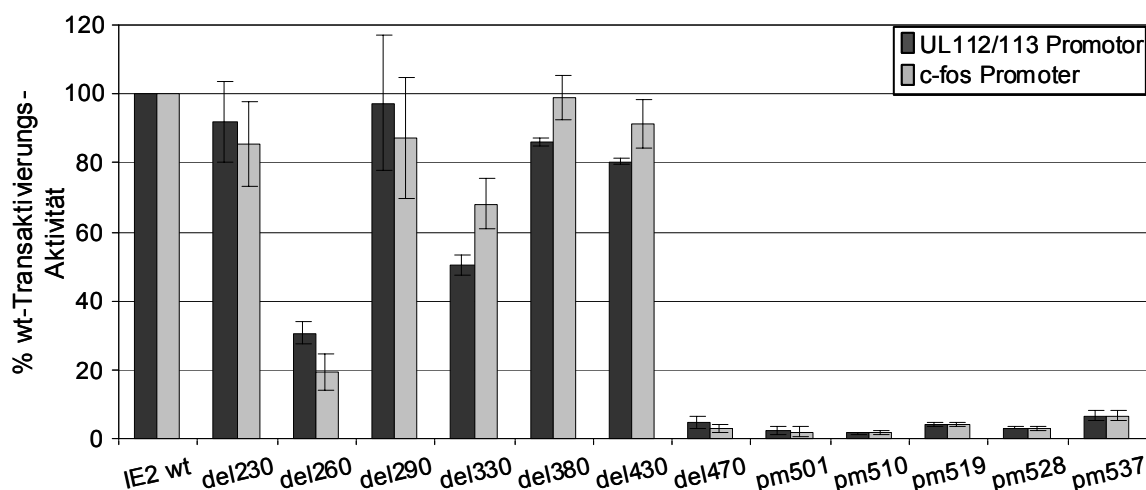


Abb. 8: Transaktivierung des UL112/113-Promotors und des c-fos-Promotors durch das wt IE2-Protein und die Mutanten.

U373-Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden sowie entweder mit einem UL112/113-Promotor- oder einem c-fos Promotor-Reporterkonstrukt transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität bestimmt. Die Induktion des Promotors, die in wt IE2 transfizierten Zellen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Zellen ermittelt wurde (bei dem UL112/113-Promotor in der Regel 50 –60-fach, bei dem c-fos Promotor 60-70-fach) wurde als 100% wt-Aktivität definiert und die Aktivität der Mutanten relativ dazu bestimmt. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Transaktivierung beider Promotoren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung.

In früheren Publikationen ist gezeigt worden, dass die Aminosäuren 290 bis 579 notwendig für die Autoregulation sind und schon kleine Mutationen zu einem Funktionsverlust führen (Ahn et al., 1998; Pizzorno et al., 1991). Dies steht teilweise im Widerspruch zu den hier beobachteten Ergebnissen (Abb.7D). Aus diesem Grund wurden einige der Mutanten auf einem weiteren MIE Promotorkonstrukt (pIE1cat) getestet, das die Nukleotide -302 bis +72 des MIE Promotors vor einem CAT-Reporter gen enthält. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 9 dargestellt.

Die Basalaktivität dieses Promotorkonstrukts ist etwas höher als bei dem zuvor verwendeten Promotorkonstrukt. In kontroll-transfizierten Zellen konnte eine CAT-Konzentration von ca. 1000 pmol/ml gemessen werden, bei dem zuvor verwendeten Konstrukt (pRR55) waren es in der Regel nur ca. 500 pmol/ml. Dies könnte auf eine unterschiedliche Transfektionseffizienz der beiden Promotorkonstrukte zurückzuführen sein. Durch die Kotransfektion mit einem IE2-Expressionsplasmid ist auch bei dem

Konstrukt pIE1cat eine deutliche Abnahme der Promotoraktivität zu beobachten, wenngleich der Effekt etwas schwächer ist als zuvor beobachtet (Vergleich Abb. 4D und Abb 9). Die Kotransfektion mit den internen Deletionsmutanten ergibt ein ähnliches Bild wie zuvor. Allerdings ist auch hier das Ausmaß der Repression geringer und dies verringert den beobachteten Unterschied zwischen der Mutante del470 und den übrigen, aktiven Mutanten.

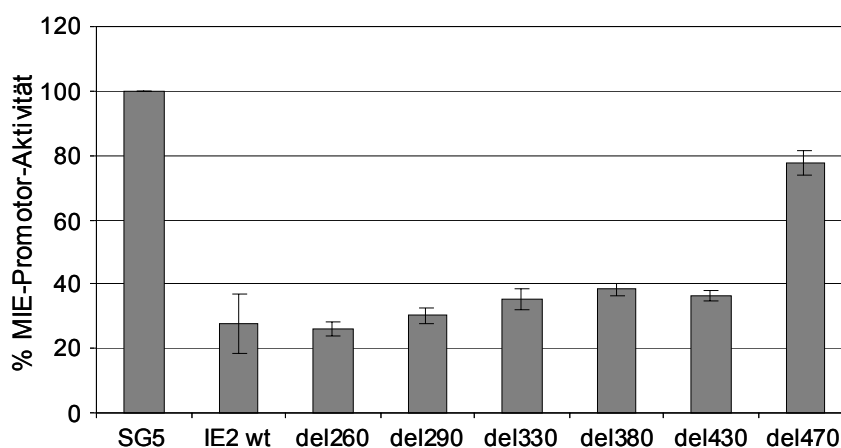


Abb. 9: Repression des MIE-Promotors durch interne Deletionsmutanten.

Autorepression des MIE Promotors durch das wt IE2 Protein und interne Deletionsmutanten. U373 Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden zusammen mit dem MIE-Promotor-Reporterkonstrukt pIE1CAT, das die Nukleotide -303 bis +72 des MIE Promotors vor einem CAT-Reportergen enthält, transfiziert, 48 h später geerntet und die CAT-Aktivität in den Zellextrakten bestimmt. Als Bezugswert diente die Basalaktivität des Promotors in kontroll-transfizierten Zellen (SG5). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass es im C-Terminus des IE2-Proteins eine Region (Aminosäuren 470 bis 544) gibt, in der wichtige regulatorische Domänen überlappen. Mutationen innerhalb dieser Region führen zu weitreichenden Funktionsverlusten. Sie scheint daher eine zentrale Kerndomäne („Core“) darzustellen. Im Gegensatz dazu ist es in dem sich N-terminal anschließenden Teil des Proteins möglich, Sequenzen zu identifizieren, die nur für bestimmte Funktionen erforderlich sind. Darüber hinaus gibt es hier auch Abschnitte, die für die Funktionalität des Proteins nicht benötigt werden.

3 Die IE2-DNA-Bindung

Da die DNA-Bindung des IE2 Proteins als eine Grundvoraussetzung für die Fähigkeit zur Autoregulation gilt (Lang und Stamminger, 1993; Liu et al., 1991; Macias und Stinski, 1993; Pizzorno und Hayward, 1990), sollte im folgenden auch die DNA-Bindungsfähigkeit der Mutanten direkt untersucht werden. Wie bereits in der Einleitung erläutert, war es in der Vergangenheit nur eingeschränkt möglich, die IE2-Bindungsaktivität mithilfe von Extrakten transfizierter Zellen nachzuweisen. Daher wurden die meisten bisher publizierten Untersuchungen zur IE2-DNA Bindung mit bakteriell exprimiertem rekombinanten IE2 Protein durchgeführt (Ahn et al., 1998; Chiou et al., 1993; Jupp et al., 1993; Lang und Stamminger, 1993; Waheed et al., 1998). In der Regel wurden hier zur besseren Aufreinigung GST-Fusionsproteine verwendet und es hat sich gezeigt, dass zum Nachweis einer DNA-Bindung nur der C-Terminus ab Aminosäure 290 benötigt wird. In der vorliegenden Arbeit sollte jedoch das gleiche experimentelle System, nämlich die Expression in permissiven Zellen, für die Untersuchung der DNA-Bindung verwendet werden, um eine direkte Vergleichbarkeit der Aktivitäten zu gewährleisten. Darüber hinaus sollten die Mutationen im Kontext des gesamten Proteins analysiert werden. Aus diesem Grunde musste zunächst ein adäquater Bindungsassay etabliert werden.

3.1 Etablierung eines DNA Bindungsassays für das HCMV IE2-Protein

Trotz zahlreicher Untersuchungen sind viele Einzelheiten der IE2-DNA Interaktion unklar. So ist das DNA-bindende Motiv im IE2 Protein noch nicht identifiziert und es kann bisher keiner Gruppe bekannten DNA-bindender Proteine zugeordnet werden. Man weiß, dass IE2 über die kleine Furche mit der DNA interagiert (Lang und Stamminger, 1994). Verschiedene bisher identifizierte IE2-Bindungsstellen weisen nur geringe Sequenzhomologien auf, so dass zu vermuten ist, dass das IE2 Protein vor allem strukturelle Merkmale der DNA erkennt (Lang und Stamminger, 1994). Der Nachweis der DNA-Bindung unter physiologisch relevanten Bedingungen gelang bisher jedoch nicht. In einer neueren Studie konnte eine DNA-Bindung gezeigt werden, nachdem das IE2 Protein aus Extrakten transient transfizierter Zellen über eine Heparin-Sepharose-Säule aufgereinigt worden war (Huang und Chen, 2002), was einen Hinweis darauf gibt, dass auch die Aufreinigungsmethode einen wesentlichen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Proteins hat und die vermutlich schwache IE2-DNA-Interaktion relativ leicht gestört werden kann.

Ausgehend von bereits publizierten Studien zu DNA Bindungsassays mit dem IE2 Protein wurden daher zunächst HeLa-Zellen mit dem IE2-Expressionsvektor transfiziert und unter möglichst schonenden Bedingungen Zellextrakte hergestellt. Hierfür wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion durch Abschaben in PBS geerntet und in einem Puffer mit geringem Salzgehalt aufgenommen (TGA-Puffer: 10 mM Tris pH 8.0, 10 % Glycerin, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT). Der Zellaufschluss erfolgte dann mit Ultraschall, unter Ausschluss von Detergentien und Proteinaseinhibitoren. Diese Aufschlussbedingungen haben sich in der Vergangenheit als besonders günstig für die Untersuchung der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren erwiesen (Truss, 1992). Generell können die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA durch die Erhöhung der Salzkonzentration abgeschwächt und die Affinität somit herabgesetzt werden. In der Regel werden Zellextrakte daher in der Gegenwart von 50-100 mM NaCl oder KCl hergestellt, um die Proteine während der Präparation von der DNA zu lösen (Latchman, 1993). Da jedoch zu erwarten war, dass die IE2-DNA-Bindung eine eher geringe Affinität aufweist, wurde auf die Zugabe von Salzen im Probenpuffer verzichtet. Bei einer Präparation der Extrakte in einem Puffer mit geringem Salzgehalt bleibt zudem die Möglichkeit bestehen, in den Bindungsansätzen verschiedene Salze und Salzkonzentrationen auszutesten.

In einem ersten Bindungsassay wurden ausgehend von bereits bekannten Informationen verschiedene Reaktionsbedingungen für den Bindungsansatz getestet. Wie bereits beschrieben wurde, ist die Bindung des IE2-Proteins sensitiv gegenüber bestimmten nicht-spezifischen Kompetitor-DNAs, die in Gel-Retardierungsexperimenten eingesetzt werden, um die Bindung unspezifischer DNA-bindender Proteine zu minimieren. Die Bindung des IE2-Proteins wurde bisher nur in der Gegenwart von poly(dA-dT)·(dA-dT) Kompetitor DNA beobachtet (Ahn et al., 1998; Chiou et al., 1993; Waheed et al., 1998). Aus diesem Grund wurden alle Reaktionen in der Gegenwart von poly(dA-dT)·(dA-dT) durchgeführt. Die Zugabe unspezifischen Proteins wie BSA zum Bindungsansatz kann in Gelretardierungsexperimenten die spezifische DNA-Protein Interaktion erhöhen. Dies beruht vermutlich darauf, dass es die Adsorption der Proteine an die Oberfläche der Reaktionsgefäße sowie der Gelplatten verhindert. Darüber hinaus beeinflusst es möglicherweise die Konformation der Protein, indem es die Anordnung der umgebenden Wassermoleküle verändert (Zhang et al., 1992). Auch für das TBP, welches ebenfalls über Interaktionen mit der kleinen Furche an die DNA bindet, konnte so die DNA-Bindung verbessert werden (Jupp et al., 1993; Liebermann, 1991). Aus diesem Grund wurde alle Bindungsansätze in der Gegenwart von BSA durchgeführt. Einem Teil der Reaktionen wurde Alkalische Phosphatase zugesetzt, da in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der DNA-Bindungsfähigkeit und dem Phosphorylierungsgrad des IE2-Proteins beschrieben worden ist (Waheed et al., 1998). Zweiwertige Kationen, wie Magnesium können ebenfalls die Bindung stabilisieren, da sie die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der DNA neutralisieren können und die DNA alternative, für die Proteinbindung möglicherweise günstigere Konformationen eingehen kann (Robidoux et al., 1992). Daher wurden einige Ansätze in der Gegenwart von MgCl_2 durchgeführt. Für den Bindungsassay wurden zunächst ca. 50 µg Protein verwendet und diese 10 min bei Raumtemperatur im Bindungsansatz inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Zielsonde und eine weitere 10-minütige Inkubation. Schließlich wurde ein Aliquot der Reaktion auf einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Ergebnis autoradiographisch ausgewertet. Als Zielsonde wurde die MIE-Promotorsequenz von -40 bis +7 verwendet, die die wt crs enthält. Bei der mutierten Sonde trägt die crs eine Mutation, so dass eine Bindung des IE2-Proteins nicht mehr möglich ist. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis eines Bindungsansatzes mit Extrakten aus HeLa-Zellen, die transient entweder mit dem

Kontrollplasmid pSG5 oder mit dem wt IE2-Expressionsplasmid bzw. einer IE2-Mutante (1-497) transfiziert wurden.

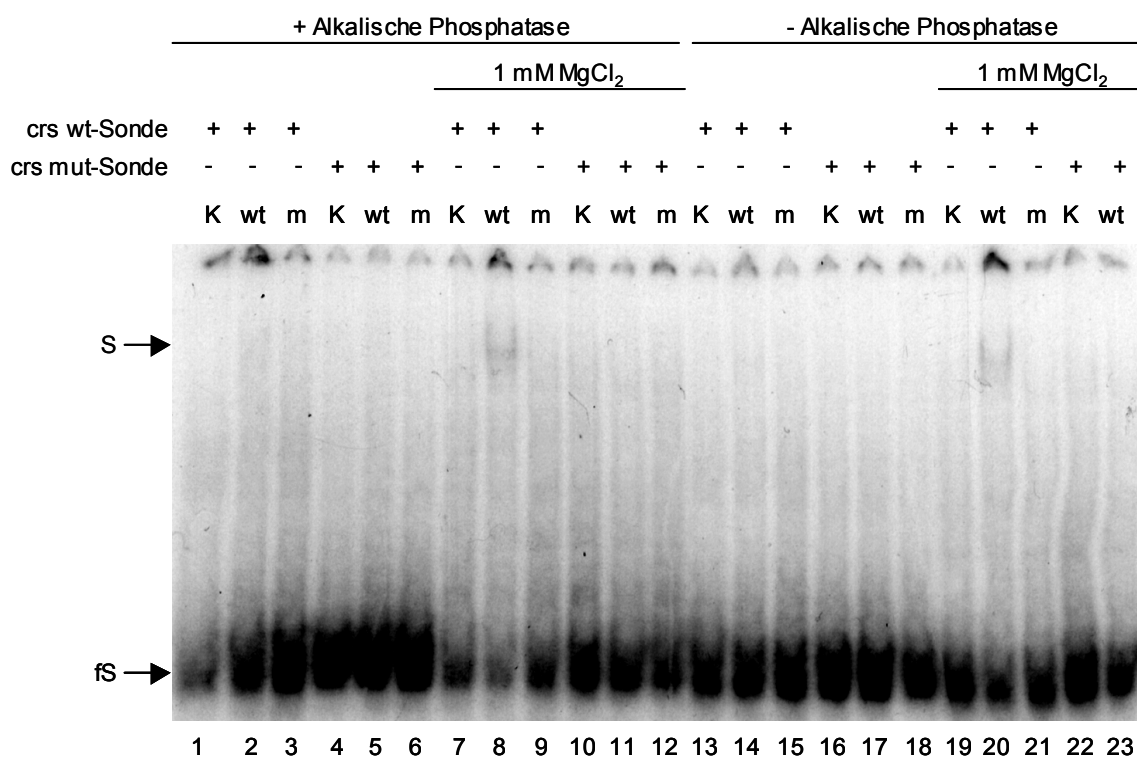


Abb. 10: Etablierung eines DNA-Bindungsassays für das IE2-Protein.

IE2-DNA-Bindungsassay unter Verwendung von HeLa-Zellextrakten. HeLa-Zellen wurden entweder mit dem leeren pSG5-3HA-Expressionsvektor (K) oder mit dem pSG5-3HA-IE2-Expressionsvektor (wt) bzw. einer IE2-Mutante (m) transfiziert und 24 h nach Transfektion geerntet. Die Zellen wurden in TGA-Puffer aufgenommen und Zellextrakte durch Ultraschallaufschluss hergestellt. Für den Bindungsansatz wurden je 5 µl (~50 µg Protein) Proteinextrakt in TE-Puffer mit 3 µg/µl BSA, 5% Glycerin und 100 ng/µl poly(dA-dT)·(dA-dT) zunächst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1,5 µl (~ 50 fmol, ~ 20.000 cpm) der markierten Sonde hinzugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation wurde ein Aliquot der Reaktion auf einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiography ausgewertet. Wo angegeben war den Reaktionsansätzen Alkalische Phosphatase bzw. MgCl₂ zugegeben worden. (S – Shift; fs – freie Sonde)

Es fällt zunächst auf, dass die Zugabe von Alkalischer Phosphatase keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins zu haben scheint, da keine Unterschiede zwischen den behandelten (Spur 1-12) und den nicht-behandelten (Spuren 13-23) Ansätzen zu sehen sind. Lediglich dort, wo $MgCl_2$ in dem Reaktionsansatz enthalten war, ist eine schwache Bande zu beobachten (Spur 8 und 20). Hier scheint es zu einer Bindung des Proteins an die markierte DNA gekommen zu sein. Da die Bande weder bei den Kontrollextrakten noch bei denen, die eine C-terminale IE2-Mutante enthalten, auftritt, ist dies ein erster Hinweis darauf, dass der beobachtete Komplex tatsächlich auf die Anwesenheit des IE2 Proteins zurückzuführen ist. Zudem ist die Bande nur dort zu beobachten, wo der Bindungsansatz die wt crs-Sonde enthält, nicht aber bei der mutierten crs-Sonde.

Da die beobachtete Bande sehr schwach war, wurden im folgenden die Reaktionsbedingungen optimiert. Eine Möglichkeit, die Bindungsfähigkeit zu verbessern, ist eine Erhöhung der Menge an unspezifischer Kompetitor-DNA, da hierdurch die spezifische Bindung verstärkt werden kann. Aus diesem Grund wurde die Menge des eingesetzten poly(dA-dT)·(dA-dT) erhöht. Außerdem können durch die Zugabe von Salzen die Reaktionsbedingungen an physiologische Salzkonzentrationen angepasst werden, was bei einigen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Sp1 und NF1-L, die Bindung verstärken kann (Robidoux et al., 1992). Da die Salzkonzentration bisher sehr niedrig war, wurden den Ansätzen NaCl zugesetzt. Wie Abbildung 8 jedoch zeigt, haben höhere poly(dA-dT)·(dA-dT)-Konzentrationen einen hemmenden Einfluss auf die DNA-Bindung des IE2-Proteins, da die Bande verschwindet. Auch die Gegenwart von NaCl verbessert die Bindung nicht. Hier kommt es im Gegenteil zum verstärkten Auftreten unspezifischer Banden, da offensichtlich die Bindungsbedingungen für unspezifisch bindende Proteine verbessert wurden. Um nachzuweisen, dass der beobachtete Komplex tatsächlich das IE2-Protein enthält, wurden den Reaktionsansätzen Antikörper zugefügt. Bei einer Bindung eines Antikörpers an das an die DNA gebundene Protein kommt es zu einer weiteren Retardierung des Protein-DNA-Komplexes im Gel, man beobachtet einen Supershift. Andererseits kann durch einen spezifischen Antikörper die DNA-Bindung auch inhibiert werden, nämlich dann, wenn der Antikörper eine Region im Protein erkennt, die für die DNA-Bindung benötigt wird.

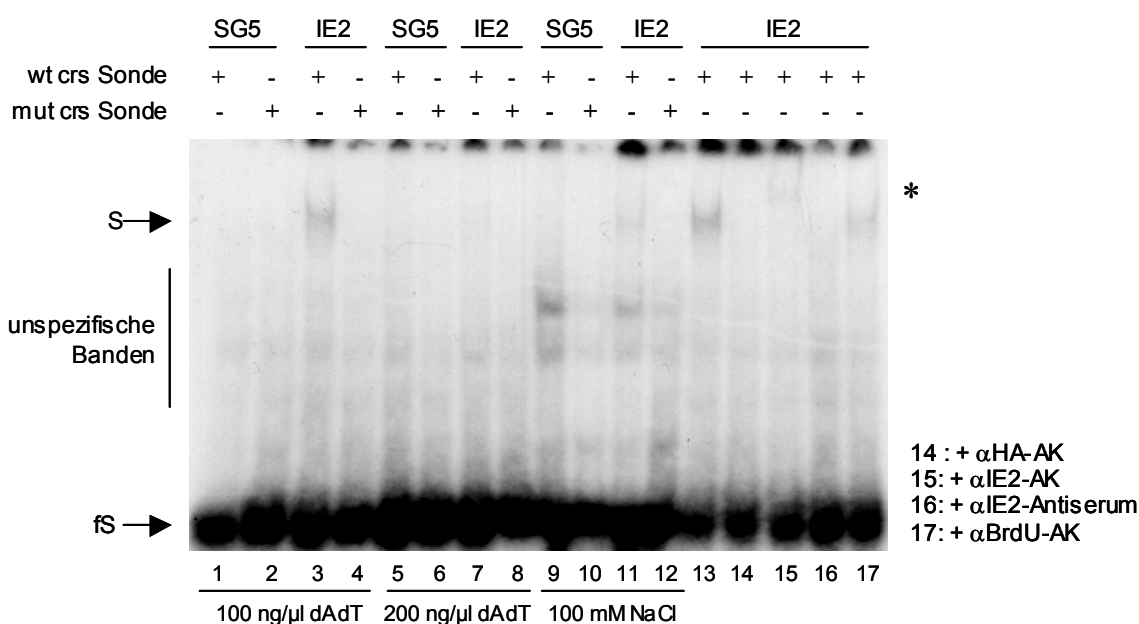


Abb. 11: IE2 aus Extrakten transfizierter Zellen bindet an eine crs enthaltende Zielsequenz.

IE2-DNA-Bindungsassay unter Verwendung von HeLa-Zellextrakten. HeLa-Zellen wurden wie unter Abb. 10 angegeben transfiziert und Zellextrakte hergestellt. Der Bindungsansatz enthielt, neben den angegebenen Mengen von poly(dA-dT)·(dA-dT), 3 μg/μl BSA, 5% Glycerin und 1mM MgCl₂. Wo angegeben wurden dem Bindungsansatz 1 μl eines Antikörpers hinzugegeben. In den Ansätzen der Spuren 9 bis 12 wurde der Bindungsansatz in Gegenwart von 100 mM NaCl durchgeführt. (S-Shift, fS-freie Sonde; * - Supershift nach Antikörperinkubation)

Für die Supershift-Experimente wurden verschiedene Antikörper eingesetzt. Sowohl der αHA-Antikörper, der gegen das N-terminale Hämagglutinin-Epitop gerichtet ist, als auch ein IE2-Antiserum, das den C-Terminus des Proteins erkennt, verhindern offensichtlich die DNA-Bindung, die Bande verschwindet (Abb.11 Spur 14 + 16). Wird dem Bindungsansatz ein gegen den N-Terminus des Proteins gerichteter Antikörper zugegeben (Spur 15), so beobachtet man einen Supershift, was zeigt, dass der Komplex tatsächlich IE2-Protein enthält. Bei Zugabe eines unspezifischen Maus-Antikörpers (Spur 16) bleibt die Bande unverändert.

Wenn, wie im vorliegenden Fall, Gesamtzellextrakte für DNA-Bindungsassays verwendet werden, spielt der Einsatz von Kompetitor-DNA eine wichtige Rolle, da hierdurch unspezifische DNA-bindende Proteine abgesättigt werden können. Wie die vorangegangenen Ergebnisse gezeigt haben, wird die Bindungsfähigkeit des IE2-

Proteins durch die Menge des eingesetzten poly(dA-dT)·(dA-dT) stark beeinflusst. Aus diesem Grunde wurde im folgenden eine Titrationsreihe durchgeführt, um die optimale Konzentration dieses Kompetitors im Bindungsansatz zu bestimmen. Wie Abbildung 12 zeigt, ist die beobachtete Komplexbildung um so stärker, je geringer die eingesetzte poly(dA-dT)·(dA-dT) - Menge ist.

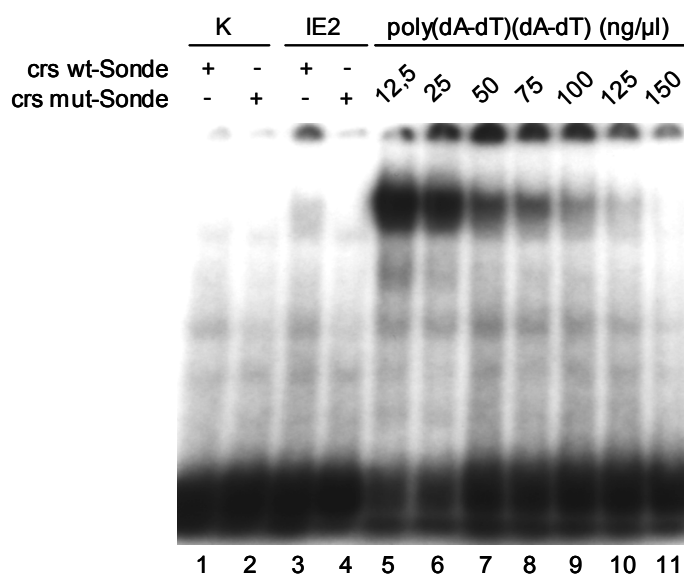


Abb. 12: Einfluss der Menge an poly (dA-dT)·(dA-dT)-Kompetitor-DNA auf die Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins.

IE2-DNA-Bindungsassay unter Verwendung von HeLa-Zellextrakten. HeLa-Zellen wurden wie unter Abb. 10 transfiziert und Zellextrakte hergestellt. Die Reaktion wurde wie unter Abb. 11 angegeben durchgeführt, wobei in den Ansätzen der Spuren 1-4 jeweils 100 ng/μl poly(dA-dT)·(dA-dT) Kompetitor enthalten waren. Die Ansätze der Spuren 5-11 wurden in der Gegenwart der angegebenen Mengen Kompetitor DNA mit der wt crs Zielsonde durchgeführt.

Neben synthetischer poly(dA-dT)·(dA-dT)-DNA wird auch poly(dI-dC)·(dI-dC)-DNA sowie heterologe DNA, wie Heringssperm DNA, zur Konkurrenz eingesetzt. Wie Abbildung 13 jedoch zeigt, wird durch die Anwesenheit schon geringer Mengen an poly(dI-dC)·(dI-dC) (Spuren 5-8) die Bindung des IE2 Proteins an die DNA komplett inhibiert. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Waheed et al., 1998) und verdeutlicht die höhere Affinität des IE2-Proteins zu den flankierenden

CG-Dinukleotiden in der crs im Vergleich zu den internen A/T-Nukleotiden. Bei Verwendung von Heringsperm-DNA ist eine Bindung noch möglich, wenngleich sie schwächer ist, als in der Gegenwart von poly(dA-dT)·(dA-dT) ((Chiou et al., 1993) und eigene Beobachtungen).

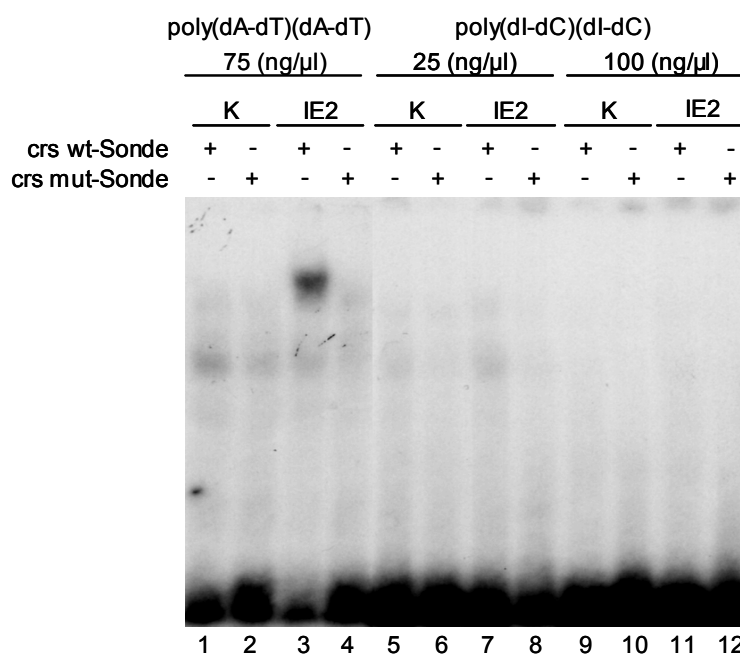


Abb. 13: Einfluss verschiedener Kompetitor DNAs auf die Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins.

IE2-DNA-Bindungsassay unter Verwendung von HeLa-Zellextrakten. HeLa-Zellen wurden wie unter Abb. 10 beschrieben transfiziert und Zellextrakte hergestellt. Der Bindungsansatz enthielt 3 μg/μl BSA, 5% Glycerin und 1mM MgCl₂ sowie die angegebenen Mengen an Kompetitor-DNA.

Abschließend wurde auch die Menge des in dem Bindungsansatzes eingesetzten Zell-Extraktes optimiert. Wie Abbildung 14 zeigt, reichen bereits geringe Mengen des Extraktes (und damit des IE2-Proteins) aus, um die DNA-Bindung nachzuweisen. Sind die Mengen des eingesetzten Proteins deutlich höher (Spuren 8-10), so nimmt die spezifische Bande ab, während ein Großteil der Reaktion nicht mehr in das Gel einläuft.

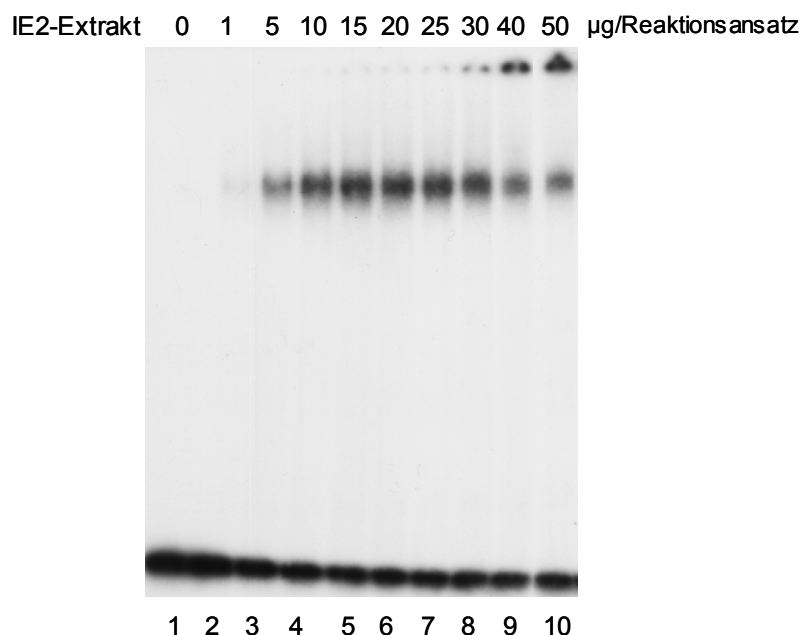


Abb. 14: Titration der Menge des eingesetzten Zellextraktes.

IE2-DNA-Bindungsassay unter Verwendung von HeLa-Zellextrakten. HeLa-Zellen wurden wie unter Abb. 10 beschrieben transfiziert und Zellextrakte hergestellt. Der Bindungsansatz enthielt 3 µg/µl BSA, 5% Glycerin, 1mM MgCl₂, und 12,5 ng/µl poly(dA-dT)·(dA-dT) sowie die angegebenen Mengen an Zellextrakten.

Ausgehend von den dargestellten Voruntersuchungen wurden folgende Reaktionsbedingungen für die nachfolgenden DNA-Bindungsassays verwendet: Zwanzig Mikrogramm Protein wurden in TE-Puffer mit 3µg/µl BSA, 5% Glycerin, 1 mM MgCl₂ sowie 12,5 ng/µl poly(dA-dT)·(dA-dT) und 5 ng/µl sonizierter, denaturierter Heringssperm-DNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte wie oben beschrieben die Zugabe der radioaktiv markierten Zielsonde sowie eine weitere Inkubation für 10 min. Danach wurde ein Aliquot der Reaktion gelelektrophoretisch aufgetrennt und der Bindungsassay autoradiographisch ausgewertet. Abbildung 15A zeigt einen DNA Bindungsassay unter optimierten Bedingungen bei Verwendung von HeLa-Zellextrakten. Man beobachtet einen starke Bande dort, wo Extrakte von IE2-transfizierten Zellen in die Reaktion eingesetzt wurde, nicht aber bei den Kontrollextrakten (SG5). Keine Bindung ist zu beobachten, wenn die crs in der Zielsonde mutiert ist.

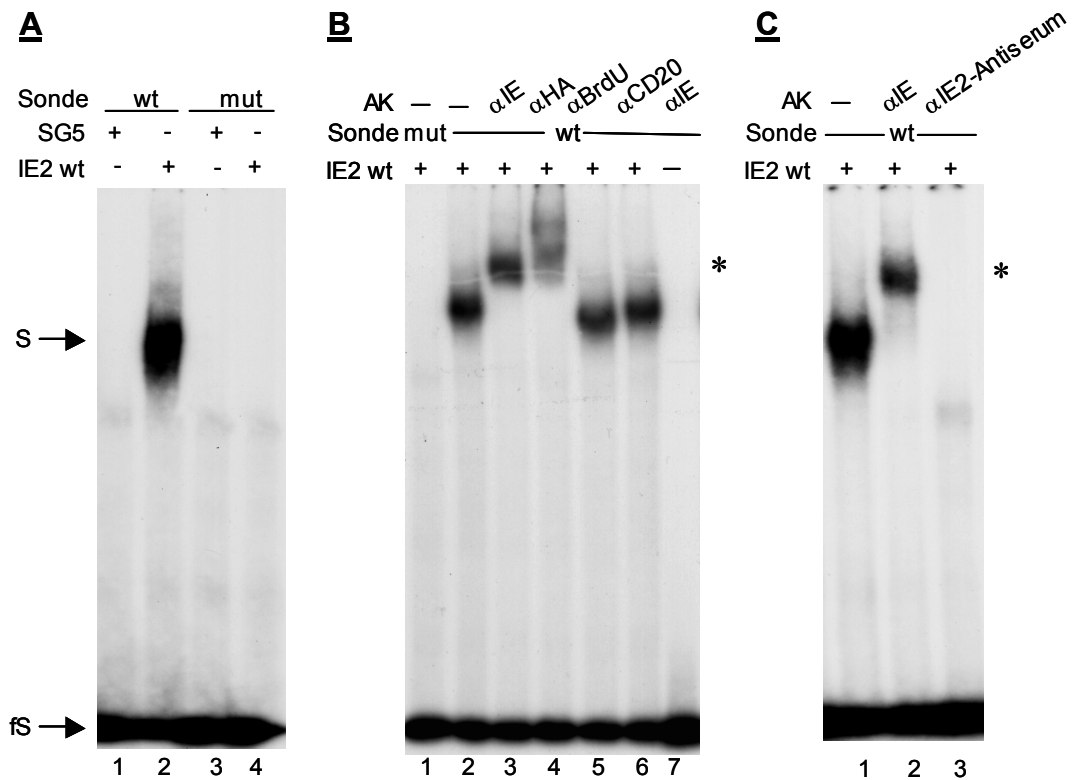


Abb. 15: Bindung des IE2-Proteins an die crs

IE2-DNA-Bindungsassay unter optimierten Bedingungen. (A) HeLa-Zellen wurden entweder mit dem leeren pSG5-3HA-Expressionsvektor oder mit dem pSG5-3HA-IE2-Expressionsvektor transfiziert und 24 h nach Transfektion geerntet. Die Zellen wurden in TGA-Puffer aufgenommen und Zellextrakte durch Sonizieren hergestellt. Für den Bindungsassay wurden 20 µg Protein in TE-Puffer mit 3 µg/µl BSA, 5% Glycerin, 1mM MgCl₂, 12,5 ng/µl poly(dA-dT)·(dA-dT) und 5 ng/µl sonizierte, denaturierte Heringssperm-DNA zunächst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1,5 µl (~ 50 fmol, ~ 20.000 cpm) der markierten Sonde hinzugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes auf einem 4%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiography ausgewertet. (B+C) Nachweis des IE2-Proteins im DNA-Protein Komplexes durch Antikörper-Supershift-Experimente. Der Bindungsassay wurde wie unter (A) angegeben durchgeführt und jeweils 1 µl (~ 0,5 µg) der angegebenen Antikörper bzw. des Antiserums dem Bindungsansatz zur ersten Inkubation hinzugegeben. (S-Shift; fs- freie Sonde; * - durch Antikörperinkubation induzierter Supershift)

Um spezifisch die Anwesenheit des IE2-Proteins in dem auftretenden Komplex nachzuweisen, wurden Supershift-Experimente durchgeführt (Abb. 15 B+C). Durch Zugabe eines IE-spezifischen Antikörpers, der den N-Terminus des Proteins erkennt, wird der gesamte Komplex im Gel retardiert. Ebenso ist unter den nunmehr optimierten Reaktionsbedingungen auch bei Verwendung des α HA-Antikörpers ein Supershift zu beobachten. Bei Zugabe von unspezifischen Antikörpern bleibt die DNA-Bindung unverändert (Abb. 15 B, Spur 5 + 6). Ebenso kann auch der IE-Antikörper alleine nicht mit der radioaktiv markierten Zielsequenz interagieren. (Abb. 15 B, Spur 7). Die Zugabe des IE2-spezifischen Antiserums hingegen führt zu einer Inhibition der DNA-Bindung (Abb. 15C, Spur 3). Da dieses Antiserum gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist, wird durch die Bindung des Antikörpers möglicherweise ein Teil der DNA-Bindungsdomäne blockiert.

Die Spezifität der Protein-DNA Interaktion lässt sich in Gelretardierungsexperimenten durch Konkurrenzexperimente mit nicht-radioaktiv-markierter spezifischer DNA demonstrieren. Hierfür wird dem Bindungsansatz gleichzeitig mit der Zugabe der radioaktiv markierten Zielsequenz ein Überschuss an nicht-markierter spezifischer DNA hinzugegeben. Das Ergebnis eines solchen Konkurrenzexperiments zeigt Abbildung 16 A. Den Bindungsansätzen wurde jeweils die crs enthaltende Targetduplex bzw. die mutierte Duplex in den angegebenen Mengen zugegeben. Wie zu sehen ist, kommt es bei der wt crs-Targetduplex schon bei einem 10-fachen Überschuss zu einer deutlichen Reduktion der DNA-Bindung an die markierte Targetduplex. Im Gegensatz dazu wird bei Verwendung der mutierten crs-Duplex selbst bei einem 100-fachen Überschuss die spezifische Bindung des IE2-Proteins an die radioaktive Sonde kaum beeinflusst. Abbildung 16 B zeigt die quantitative Auswertung dieser Konkurrenz. Hier wird deutlich, dass die nicht markierte wt-Targetduplex schon bei einem 5-fachen Überschuss die Bindung an die radioaktiv markierten Sonde kompetiert, was die Spezifität der IE2-DNA Interaktion demonstriert. Bei einem 10-fachen Überschuss der wt-crs-Duplex liegt die Konkurrenz bereits bei 80%, während ein 100-facher Überschuss der Zielsequenz mit mutierter crs nur einen geringen Effekt hat.

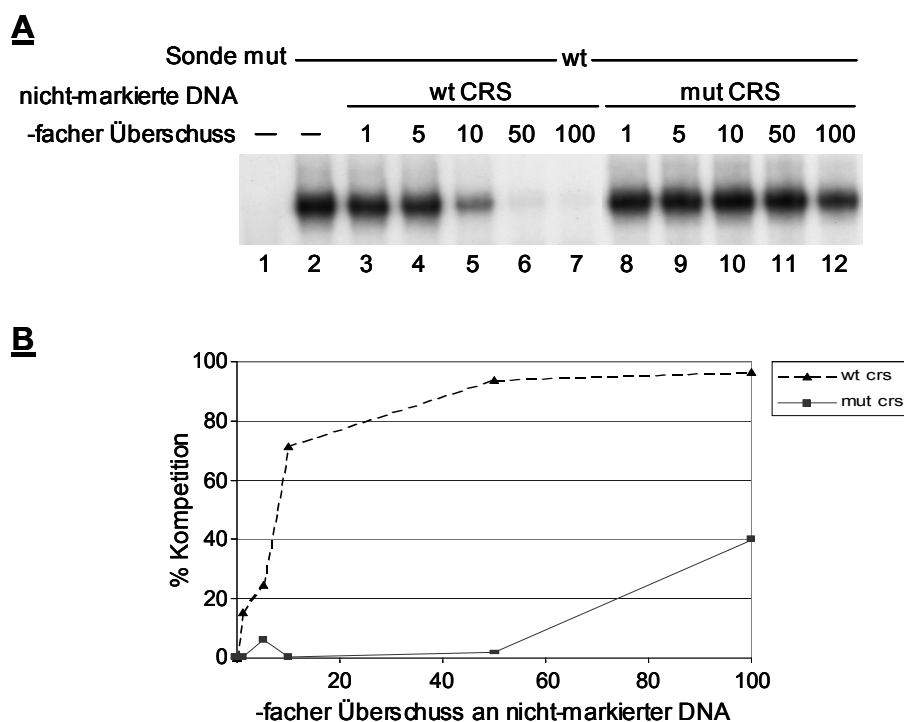


Abb. 16: Nachweis der Spezifität der IE2-DNA-Interaktion über Konkurrenz mit nicht-markierter DNA

(A) Nachweis der Spezifität der IE2-DNA-Interaktion mittels Konkurrenz mit nicht-markierter spezifischer DNA. Der Bindungsassay wurde wie unter (Abb.15A) angegeben durchgeführt. Gleichzeitig mit Zugabe der radioaktiv markierten Sonde wurde entweder die nicht-markierte wt crs oder die mutierte crs Zielduplex in dem jeweils angegebenen Überschuss zu dem Bindungsansatz gegeben. (D) Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperiments. Das Gel des unter (A) dargestellten Bindungsassays wurde mittels PhosphorImager und der *Aida Image Analyzer* Software ausgewertet und die Intensität der Banden quantifiziert.

Da es das Ziel war, einen DNA-Bindungsassay zu etablieren, der den Nachweis der IE2-DNA-Bindung auch unter physiologisch relevanten Bedingungen erlaubt, wurde im folgenden die DNA-Bindung in den HCMV-permissiven U373-Zellen untersucht. Wie zuvor die HeLa-Zellen wurden diese mit einem IE2-Expressionsplasmid transfiziert, 46 h später geerntet und der Bindungsassay wie bereits erläutert durchgeführt. Abbildung 17 A zeigt das Ergebnis eines solchen Assays. Auch hier ist deutlich eine Komplexbildung zu beobachten, und zwar spezifisch nur dort, wo IE2 in den Extrakten enthalten und die crs in der Targetduplex intakt war (Spur 2 im Vergleich zu Spur 4). Das spezifisch IE2 in dem Komplex enthalten ist, zeigt Spur 3, da wiederum durch die Zugabe eines IE-spezifischen Antikörpers ein Supershift induziert wird. Im Vergleich zu den

Bindungsassays mit HeLa-Zellextrakten ist die beobachtete Bande jedoch deutlich schwächer und der Hintergrund insgesamt stärker. Dies ist vermutlich auf die deutlich geringere Transfektionseffizienz in U373-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen zurückzuführen. Abbildung 13 B zeigt eine Immunoblot-Analyse der Extrakte von transfizierten HeLa- und U373-Zellen. Wie man sieht, führt die geringere Transfektionseffizienz zu deutlich geringeren Expressionsleveln des transfizierten Proteins.

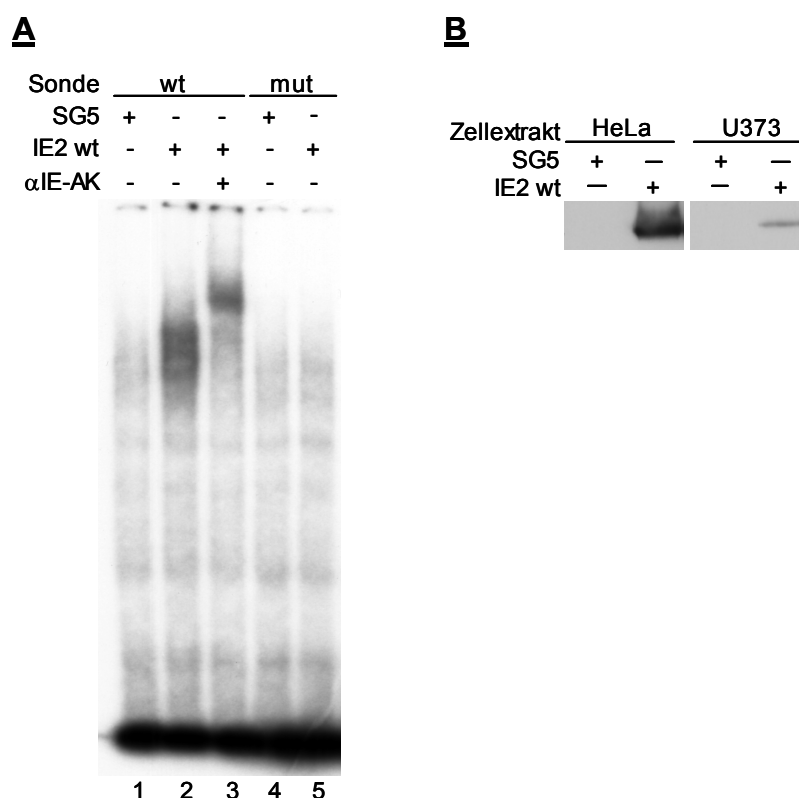


Abb. 17: Spezifische DNA-Bindung des IE2-Protein aus Extrakten transfizierter U373-Zellen.

(A) U373-Zellen entweder mit dem leeren pSG5-3HA-Expressionsvektor oder mit dem pSG5-3HA-IE2-Expressionsvektor transfiziert und 46 h nach Transfektion wie unter Abb. 10 angegeben geerntet und der Bindungsassay durchgeführt. Wo angegeben wurde 1 μ l (\sim 0,5 μ g) eines IE-spezifischen Antikörpers dem Bindungsansatz hinzugegeben. (B) Immunoblotanalyse der Extrakte transfizierter HeLa- und U373-Zellen. Jeweils zwanzig Mikrogramm des Zellextrakts wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Menge des IE2-Proteins parallel durch Immunoblot-Analyse mittels HA-Antikörper nachgewiesen.

Erlaubt der entwickelte Bindungsassay den Nachweis der DNA-Bindung unter physiologisch relevanten Bedingungen, so sollte diese auch im Rahmen einer Virusinfektion zu beobachten sein. Bisher ist aufgrund der bereits erwähnten Schwierigkeiten die Darstellung der IE2-DNA-Interaktion während der viralen Infektion nicht möglich gewesen. Daher ist bisher auch unklar, wann eine solche DNA-Bindung auftritt.

Um zu untersuchen, ob und zu welchen Zeitpunkten während der Virusinfektion eine Bindung des IE2 an die DNA mithilfe des entwickelten Assays nachzuweisen ist, wurden U373-Zellen mit HCMV infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und mit den Extrakten DNA-Bindungsassays durchgeführt. Abbildung 18 A zeigt das Ergebnis eines solchen Gelretardierungsexperiments. Während zu frühen Zeitpunkten noch keine DNA-Bindung nachzuweisen ist (Abb. 18 A, Spuren 2-4), tritt 48 h nach der Infektion eine Komplexbildung auf, die im weiteren Verlauf immer stärker wird. Dies bedeutet, dass auch während der Virusinfektion produzierte IE2 in der Lage ist, *in vitro* an die DNA zu binden. Dass diese DNA-Bindung abhängig von einer intakten crs ist, zeigt der rechte Teil der Abb. 18A. Bei einer mutierten crs ist keine spezifische Bindung nachzuweisen. Während der Virusinfektion treten neben der 86 kDa-Form des IE2-Proteins weitere Isoformen auf, die teils durch alternatives Spleißen und teils durch Transkription von einem internen Promotor generiert werden. Daher ist es möglich, dass die beobachteten DNA-Protein-Komplexe auch Isoformen enthalten. Die nach Inkubation mit Extrakten infizierter Zellen versus transfizierter Zellen auftretende Bande ist weniger distinkt und insgesamt etwas breiter als die bei einer transienten Expression des IE2 in den Zellen. Dies könnte ein Hinweis auf eine andere Komplexzusammensetzung sein. Abbildung 18 B zeigt einen Immunoblot der Virusextrakte mit einem gegen das IE2-Protein gerichteten Antiserum. Wie zu erkennen ist, sind erst nach 48 h größere Mengen des IE2p40-Proteins nachzuweisen, von dem bereits gezeigt wurde, dass es den MIE Promotor reprimieren kann (Jenkins et al., 1994). Allerdings ist zu diesem Zeitpunkt auch bei der IE55-Variante und bei dem IE2-Protein eine Steigerung zu beobachten, so dass noch keine Aussage darüber möglich ist, welche IE-Varianten möglicherweise in dem Komplex enthalten sind.

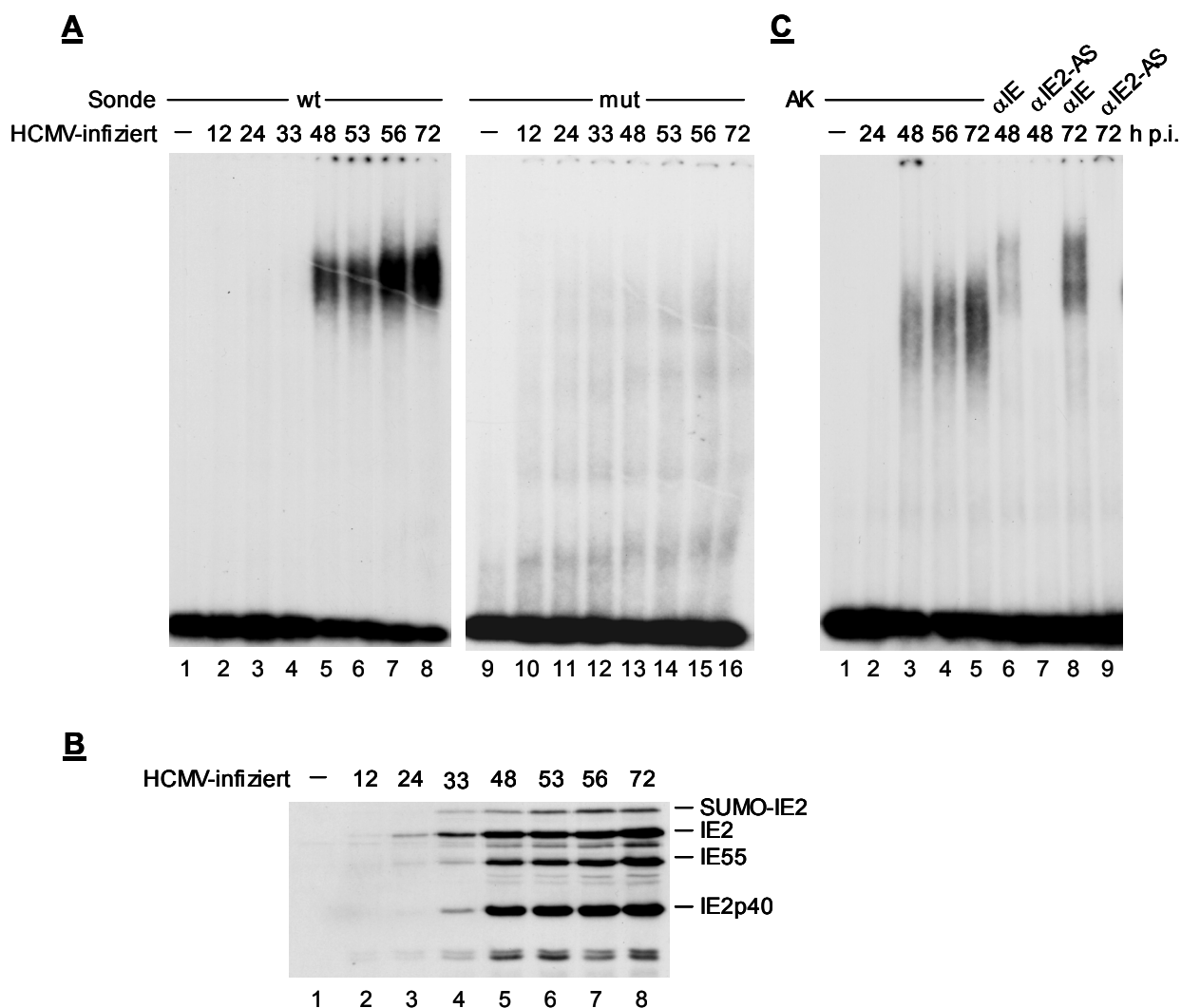


Abb. 18: Nachweis der IE2-DNA-Interaktion während der viralen Infektion.

U373 Zellen wurden mit HCMV AD169 mit einer PfU (Plaque forming unit) von 5 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion geerntet. Zellextrakte wurden wie unter Material und Methoden und Abb.10 beschrieben hergestellt und 20 µg Proteinextrakt in den Bindungsassay (Durchführung siehe Abb. 15) eingesetzt. (A) DNA-Bindung des IE2-Proteins im Verlauf der Infektion. (B) Immunoblot-Analyse der Viruszellextrakte. Jeweils 10 µg der Proteinextrakte wurden auf einem 8%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und der Immunoblot wie unter Abb. 5 durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mithilfe eines IE2-spezifischen Antiserums. (C) Nachweis des IE2-Proteins im DNA-Protein-Komplex durch Antikörper-Supershift-Experimente. Der Bindungsassay wurde wie beschrieben durchgeführt und dem Bindungsansatz vor Zugabe der radioaktiv markierten Zielsequenz 1 µl (~ 0,5 µg) des jeweils angegebenen Antikörpers bzw. Antiserums zugesetzt.

Um die Spezifität des DNA-Protein-Komplexes nachzuweisen, wurden wiederum Supershift-Experimente durchgeführt. Abbildung 18C zeigt, dass sich sowohl zu 48h als auch 72h nach der Infektion der Komplex durch Zugabe eines IE-spezifischen

Antikörpers zu einer weiteren Retardierung der Bande kommt. Dieser Antikörper erkennt den N-Terminus des IE2-Proteins und damit z.B. die Spleißvariante IE55, nicht jedoch das late IE2p40-Protein. Von dem IE55-Protein ist bereits gezeigt worden, dass es nicht an die DNA binden kann (Hermiston et al., 1990). Die Zugabe des IE2-spezifischen Antiserums, das auch das IE2p40-Protein erkennt, führt, wie schon zuvor beobachtet (siehe Abb. 15C) zu einem Verlust der DNA-Bindung.

Die Ergebnisse zeigen, dass der entwickelte Bindungsassay es erlaubt, die DNA-Bindung des IE2 Proteins zuverlässig nachzuweisen, unabhängig davon, ob das Protein während einer transienten Transfektion oder während der Virusinfektion gebildet wurde. Darüber hinaus ist es nun möglich die verschiedenen IE2-Mutanten innerhalb des gleichen experimentellen Systems auf ihre Autorepression und ihre direkte DNA-Bindung hin zu untersuchen.

Da aufgrund der besseren Transfektionseffizienz die IE2-DNA-Bindung am besten in HeLa-Zellextrakten zu beobachten war, wurden auch die folgenden Versuche in HeLa-Zellen durchgeführt. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass die Autorepression des MIE Promotors durch IE2 auch in anderen, nicht-permissiven Zelllinien wie Vero-oder HeLa-Zellen gezeigt werden kann (Pizzorno und Hayward, 1990; Tsai et al., 1997). Dass dies auch auf das von uns verwendete HeLa System zutrifft, zeigt Abb.19. Wie zuvor in den U373-Zellen wurden hier in HeLa-Zellen Kotransfektionsexperimente mit dem MIE Promotor durchgeführt. In Anwesenheit des IE2-Proteins wird der Promotor ebenso reprimiert wie durch die Mutante del430, während die Mutante del470 inaktiv ist.

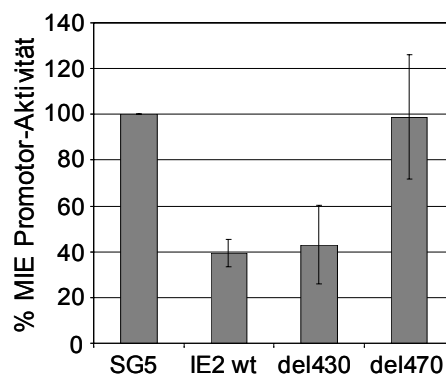


Abb. 19: IE2-vermittelte Repression des MIE Promotors in HeLa-Zellen.

HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden sowie mit dem MIE Promotor-Reporterkonstrukt transfiziert und 24 h nach der Transfektion geerntet. Die CAT-Aktivität in den Extrakten wurde mittels CAT-ELISA ermittelt und die relative Aktivität des Promotors im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen bestimmt.

3.2 Die DNA-Bindung C-terminaler IE2-Mutanten

Nach bisherigen Studien erstreckt sich die DNA-Bindungsdomäne des IE2-Proteins von Aminosäure 346 bis 579 (Chiou et al., 1993; Waheed et al., 1998), wobei für die Autorepression darüber hinaus auch die Aminosäuren 290 bis 346 benötigt werden (Hermiston et al., 1990; Pizzorno et al., 1991; Stenberg et al., 1990). Um die bisher erhaltenen Daten zur Autoregulation mit der DNA-Bindung zu korrelieren, sollte daher untersucht werden, wie sich die IE2-Mutanten in dem DNA-Bindungsassay verhalten. Zunächst wurden die C-terminalen Mutanten auf ihre DNA-Bindungsfähigkeit getestet. Das Ergebnis sind in Abbildung 20 A und B dargestellt. Keine der C-terminalen Deletionsmutanten (Abb. 20 A) und auch keine der AS-Austauschmutanten (Abb. 15 B) ist zur DNA-Bindung fähig. Im Gegensatz dazu kommt es sowohl mit dem wt Protein als auch in Anwesenheit einer N-terminalen Deletionsmutante (195-580) zu einer Komplexbildung mit der DNA. Da sowohl die Mutante 1-544 als auch die Mutante 195-580 einen Zellzyklusarrest induzieren können, aber die erstgenannte nicht mehr in der Lage ist, DNA zu binden, zeigt dieses Ergebnis auch, dass die Fähigkeit, einen Zellzyklusarrest zu induzieren unabhängig von der DNA Bindungsfähigkeit ist.

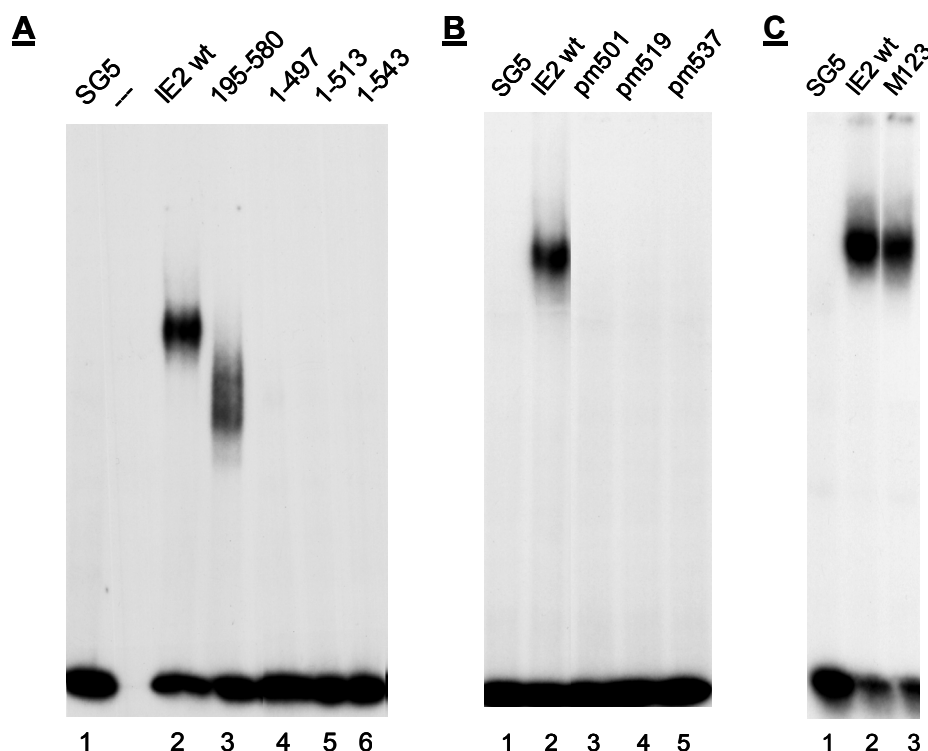


Abb. 20: C-terminale Mutationen zerstören die DNA-Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins.

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und 24 h nach der Transfektion geerntet. Zellextrakte wurden wie unter Abb. 15 beschrieben hergestellt und jeweils 20 µg Proteinextrakt für den Bindungsassay eingesetzt. Anschließend wurde ein Aliquot der Reaktion auf einem 4%igen Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie auf Kodak X-Omat Filmen ausgewertet. (A) DNA-Bindung N- und C-terminaler Deletionsmutanten. (B) DNA-Bindung C-terminaler AS-Austauschmutanten. (C) DNA-Bindung einer IE2-Phosphorylierungsmutante.

Abbildung 20 C zeigt eine weitere Mutante mit einer Triple-Punktmutation im N-terminalen Bereich des Proteins, bei der potentielle Phosphorylierungsstellen (T₂₇, S₁₄₄, T₂₃₃/S₂₃₄) durch Alanine substituiert wurden. Von dieser Mutante ist gezeigt worden, dass sie transkriptionell aktiv ist und ihre Mutation im viralen Kontext keine Auswirkungen hat (Heider et al., 2002). Allerdings hat die Mutation dieser drei Phosphorylierungsstellen Auswirkungen auf die Phosphorylierung anderer Bereiche des Proteins (Harel und Alwine, 1998). Wie in Abbildung 20 C zu sehen ist, hat dies jedoch keinen Einfluss auf die DNA-Bindung, was nochmals demonstriert, dass die Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins vermutlich nicht über seine Phosphorylierung reguliert wird.

Alle Mutanten wurden auch in einem Bindungsassay mit der crs-mutierten Targetduplex auf unspezifische DNA-Bindung getestet. Da bei keiner der Mutanten

eine unspezifischen Bindung auftrat, wurde auf die Darstellung dieser Bindungsassays an dieser Stelle verzichtet.

3.3 Die DNA-Bindung interner Deletionsmutanten

Im folgenden wurden nun all jene internen Deletionsmutanten auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht, die innerhalb der bisher definierten Autoregulationsdomäne zwischen Aminosäure 290 und 580 liegen. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis für die Deletionsmutanten del290 bis del470. Während del470 nicht mehr an die DNA bindet, kommt es bei del290, del380 und del430 zur Komplexbildung an der DNA. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen aus den Autorepressionsexperimenten. Eine Ausnahme ist die Mutante del330, da sie im Vergleich zu den anderen keine Bindungsaktivität zeigt, obwohl sie in den Autorepressionsexperimenten aktiv war (Abb. 21 A). Allerdings ist bei dieser Mutante wiederholt beobachtet worden, dass bei längeren Expositionen eine schwache Bande etwas oberhalb der üblichen IE2-DNA-Bande auftritt (siehe Abb. 21 B, Spur 4, und Abb. 21 C, Spur 4). Eine derartige Bande ist weder bei Kontrollextrakten noch bei einer der anderen IE2-Mutanten beobachtet worden. Dies lässt vermuten, dass bei dieser Mutante eine geringe Fähigkeit zur Interaktion mit der DNA vorhanden ist.

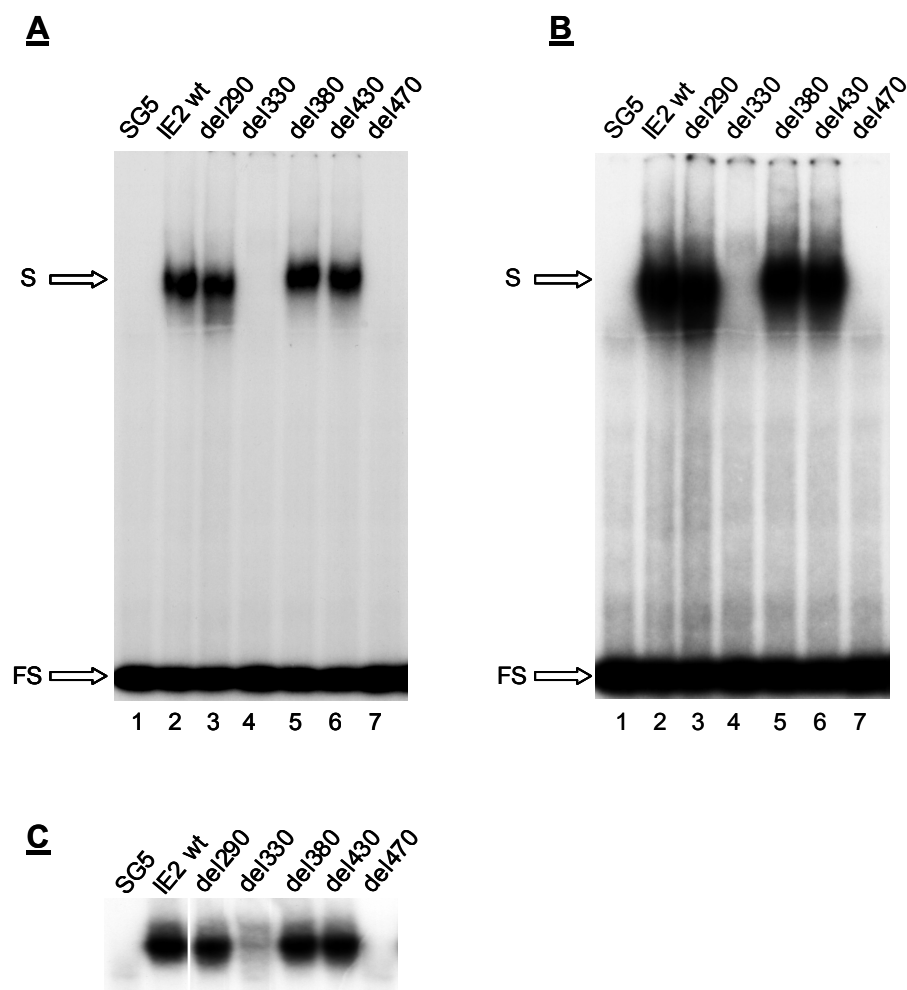


Abb. 21: DNA-Bindung der internen Deletionsmutanten.

(A) HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und 24 h nach der Transfektion geerntet. Zellextrakte wurden wie beschrieben hergestellt und jeweils 20 µg Proteinextrakt für den Bindungsassay eingesetzt. Anschließend wurde ein Aliquot der Reaktion auf einem 4%igen Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie auf Kodak X-Omat Filmen ausgewertet. (B) Autoradiographie des gleichen Bindungsassays nach längerer Exposition. (C) Exemplarische Darstellung eines weiteren DNA-Bindungsassays mit den internen Deletionsmutanten zur Demonstration der residualen Bindung der Mutante del330. Durchführung wie unter (A).

Die Ergebnisse zeigen, dass die bezüglich Autoregulation erhaltenen Daten mit denen der DNA-Bindung korrelieren. Zudem scheint auch die DNA-Bindung hauptsächlich über die komplexe C-terminale Proteindomäne vermittelt zu werden, während eine Mutation N-terminal von AS 470 nicht zwangsläufig zu einem Funktionsverlust führt.

3.4 Die postulierte Zinkfingerdomäne

Die Mutante del430 liegt außerhalb der C-terminalen Proteindomäne und zeigt bezüglich aller Aktivitäten dem Wildtyp vergleichbare Level. Dies ist insofern bemerkenswert als diese Mutation im Bereich eines potentiellen DNA-Bindungsmotives im IE2-Protein liegt. Zwischen den Aminosäuren 428 und 452 befindet sich eine postulierte Zinkfingerdomäne. Hierbei handelt es sich um einen singulären Cystein-Histidin-Zinkfinger. Mithilfe von Mutationsanalysen ist gezeigt worden, dass eine Mutation entweder der Cysteine oder der Histidine zu einem Verlust der Autorepression und DNA-Bindungsaktivität führt (Bresnahan et al., 1998; Jupp et al., 1993; Macias und Stinski, 1993; Yeung et al., 1993). Die Mutante del430 jedoch ist nicht nur aktiv in Bezug auf Autorepression und Transaktivierung, sondern zeigt auch eine dem Wildtyp vergleichbare DNA-Bindungsaktivität (Abb. 16A, Spur 6)

In Abbildung 22 A ist die Aminosäuresequenz des Wildtyp-Proteins in diesem Bereich sowie im Vergleich dazu die Mutante del430 und eine beschriebene Zinkfinger-Mutante dargestellt. In der Zinkfinger-Mutante IE2 HL sind die Histidine durch Leucine ersetzt worden (Yeung et al., 1993), während bei der del430 der mittlere Teil der Zinkfinger-Domäne entfernt wurde. Um die Effekte dieser beiden Mutationen zu vergleichen, wurden die Mutanten parallel in einem Bindungsassay getestet. Da die cDNA der Zinkfingermutante auf das IE2 des HCMV Town- Stamm zurückzuführen ist, wurde auch das parentale Town IE2 auf seine DNA-Bindungsfähigkeit in diesem Assay getestet. Abbildung 22 B zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.

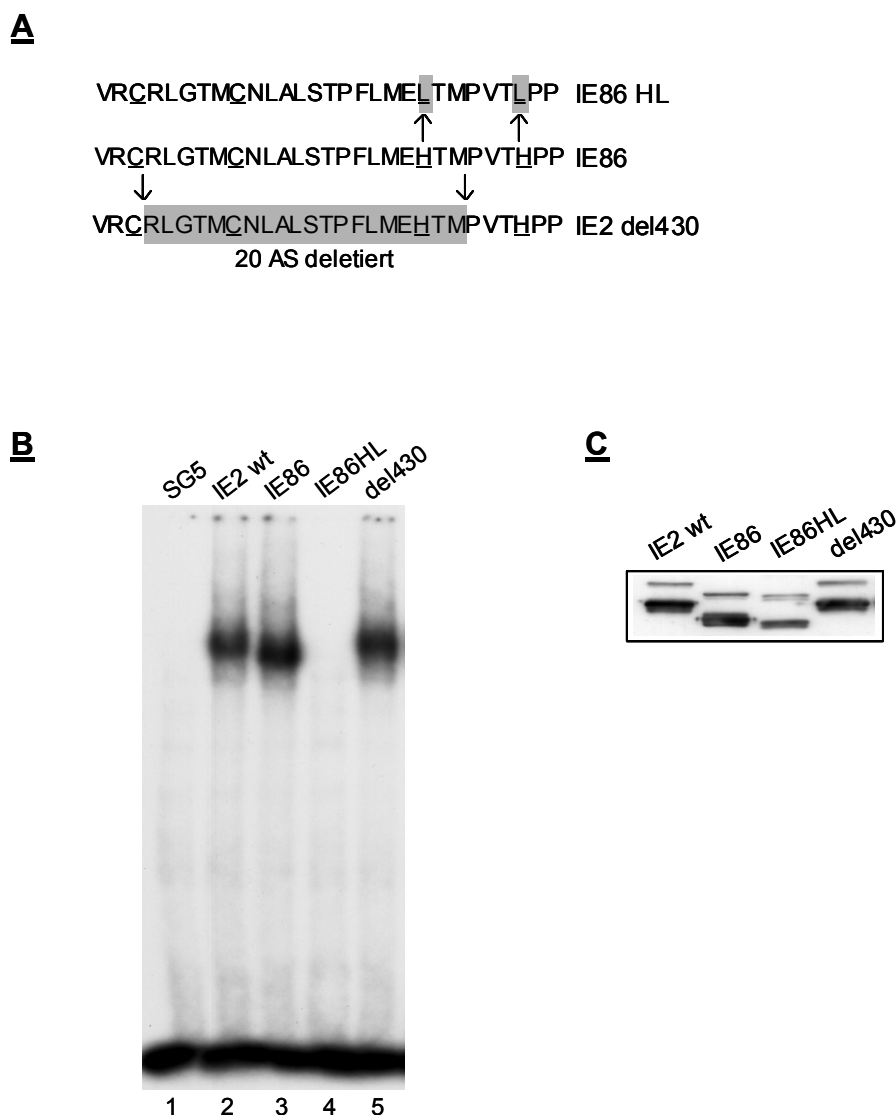


Abb. 22: Die putative Zinkfingerdomäne wird für die DNA-Bindung nicht benötigt.

(A) Aminosäuresequenz des IE2-Proteins im Bereich der putativen Zinkfingerdomäne (AS428-452). Dargestellt sind neben dem wt-Protein auch eine Zinkfingermutante (IE2 HL), in der die beiden Histidine durch Leucine ersetzt wurden, sowie die Mutante del430. Die zwanzig deletierten Aminosäuren sind grau unterlegt. (B) Bindungsassay mit Extrakten aus transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für das wt IE2 Protein aus AD169 (IE2 wt) sowie das Town IE2 (IE86) und die beiden Mutanten (IE86-HL und del 430) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen wie unter Abb. 15 angegeben geerntet und der Bindungsassay durchgeführt. (C) Immunoblotanalyse zum Nachweis der IE2 Proteine. Jeweils 10 µg der Zellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das IE2 Protein durch Immunoblotanalyse mittels α -IE-Antikörper nachgewiesen.

Wie zu erwarten war, ist sowohl das IE2 aus dem AD169-Stamm als auch das IE2 aus dem Town-Stamm in der Lage, an die DNA zu binden. Auch bei der Mutante del430 kommt es zu einer Komplexbildung mit der DNA. Im Falle der Zinkfingermutante IE86HL jedoch ist keine DNA-Bindung zu beobachten. Damit zeigt diese Mutante hier das gleiche Verhalten wie in den publizierten Studien, in denen mit bakteriell exprimierten rekombinanten Proteinen gearbeitet wurde. Dies bedeutet, dass die in der DNA-Bindung beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Mutanten weder auf die unterschiedlichen parentalen IE2-Formen noch auf unterschiedliche experimentelle Systeme zurückzuführen sind. Darüber hinaus demonstriert dieses Ergebnis die unterschiedliche Qualität der beiden Mutationen. So scheint die Punktmutation der Histidine weitreichendere Auswirkungen auf den C-Terminus des Proteins zu besitzen und darüber zu einem generellen Funktionsverlust zu führen. Im Gegensatz dazu bleibt eine nahezu komplette Deletion des Zinkfingers folgenlos, was zeigt, dass dieser weder für die DNA-Bindung, noch für die Autorepression, die Transaktivierung oder den Zellzyklusarrest notwendig zu sein scheint.

Alle vier Proteine zeigen vergleichbare Expressionslevel (Abb. 22C), wenngleich diese bei der Zinkfingermutante etwas niedriger sind, als beim entsprechenden Wildtyp (IE86). Vorangegangene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass diese Mengen ausreichend sind, um eine DNA-Bindung beobachten zu können. Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigt das IE2 aus dem Town-Stamm ein anderes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel als das IE2 des AD169, obwohl das letztgenannte nur eine Aminosäure mehr besitzt (Cameron und Preston, 1981; Gibson, 1981). Die Ursache dieses veränderten Laufverhaltens ist unklar, jedoch scheinen posttranslationale Modifikationen nicht involviert zu sein, da dieser Effekt auch mit *in vitro* translatiertem IE2 beobachtet werden kann. Im vorliegenden Fall kommt hinzu, dass die in dieser Arbeit verwendeten IE2 Protein des AD169 Stammes (IE2 wt und del430) N-terminal ein HA-Epitop für den Nachweis in der Immunoblotanalyse besitzen, welches ebenfalls zu den beobachteten Unterschieden im Laufverhalten mit beiträgt.

IV. Diskussion

Das IE2 Protein repräsentiert den wichtigsten Regulationsfaktor im Rahmen des lytischen Infektionszyklus. Es ist ein essentieller Transaktivator der frühen und späten Genexpression und in der Lage, seine eigene Expression durch direkte Bindung an den MIE Promotor zu regulieren. Darüber hinaus besitzt das IE2 bemerkenswerte zellzyklusregulatorische Eigenschaften, da es sowohl pro- als auch antiproliferative Aktivitäten in sich vereint.

Aufgrund seiner besonderen Bedeutung für das Virus stand und steht das IE2-Protein im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen. Dennoch ist die Bedeutung einzelner Funktionen bis heute nicht vollständig geklärt. So ist z.B. die physiologische Relevanz der IE2-vermittelten Autorepression oder des Zellzyklusarrest noch immer unklar.

Viren, in denen das IE2-Protein deletiert oder durch Mutation inaktiviert ist, sind nicht replikationsfähig. Auch stehen stabil exprimierende Zelllinien nicht zur Verfügung, um etwaige Defekte *in trans* zu komplementieren. Da gerade der C-Terminus des Proteins für die Funktionalität, und auch für die Transaktivierung, eine große Rolle spielt und hier die regulatorischen Domänen zahlreicher Aktivitäten überlappen, erschwert dies zusätzlich die Analyse einzelner Funktionen. Zwar gibt es bereits einige Untersuchungen rekombinanter Zytomegalieviren, deren IE2 mutiert ist, doch hat sich gezeigt, dass die beobachteten Effekte nur bedingt dem Verlust spezifischer Funktionen zugeordnet werden kann (Heider et al., 2002; Marchini et al., 2001; Sanchez et al., 2002; White et al., 2004). Aus diesem Grunde ist eine möglichst präzise Kenntnis der regulatorischen Domänen des IE2 Proteins von essentieller Bedeutung, um in Zukunft Fragestellungen zur physiologischen Relevanz einzelner Funktionen direkter bearbeiten zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Struktur-Funktionsanalyse des HCMV IE2 Proteins durchgeführt. Ziel der Analyse war es, die unterschiedlichen funktionellen Domänen des IE2 Proteins genauer zu definieren und zu untersuchen, inwieweit diese Domänen überlappen oder strukturell unabhängig sind. Längerfristig soll so der Weg geebnet werden, um diskriminierende Mutationen im viralen Kontext untersuchen zu können. Hierfür wurden verschiedene IE2-Mutanten generiert und auf ihre

Funktionsfähigkeit bezüglich Induktion eines Zellzyklusarrests, Transaktivierung, Autoregulation und DNA-Bindung hin untersucht.

1 Die IE2-DNA-Bindung

Wie in der Einleitung erläutert, war in der Vergangenheit von Schwierigkeiten berichtet worden, die direkte Bindung des IE2-Proteins an die DNA nachzuweisen (Chiou et al., 1993; Lang und Stamminger, 1994), weshalb der Großteil der Studien bisher mit bakteriell exprimierten rekombinanten Proteinen durchgeführt wurde (Ahn et al., 1998; Chiou et al., 1993; Jupp et al., 1993; Lang und Stamminger, 1993; Lang und Stamminger, 1994; Macias et al., 1996; Macias und Stinski, 1993; Waheed et al., 1998). Als mögliche Ursache für die beobachteten Schwierigkeiten wurden die eher ungewöhnlichen Bindungseigenschaften des IE2 Proteins diskutiert. IE2 bindet an die DNA über Interaktionen mit der kleinen Furche (Lang und Stamminger, 1994) und ist sensitiv gegenüber bestimmten Kompetitor-DNAs, wie poly(dI-dC)·(dI-dC) (Chiou et al., 1993). Ein Vergleich der bisher identifizierten IE2-Bindungsstellen innerhalb des MIE sowie eines HCMV *early* Promotors ergibt zudem nur eine geringe Ähnlichkeit der jeweiligen Bindungssequenzen. IE2 scheint demnach mit einem breiten Spektrum sehr unterschiedlicher Zielsequenzen zu interagieren und vornehmlich strukturelle Eigenschaften der DNA zu erkennen (Arlt et al., 1994). Darüber hinaus wurde auch eine Abhängigkeit der Bindungsfähigkeit vom Modifikationsgrad des Proteins diskutiert, da eine DNA-Bindung des IE2 aus Extrakten von stabil exprimierenden Zellen gezeigt werden konnte, wenn die Extrakte mit Phosphatase behandelt wurden (Ahn et al., 1998).

In einer neueren Studie konnte jedoch eine DNA-Bindung nachgewiesen werden, wenn das IE2-Protein aus Extrakten transient transfizierter Zellen über eine Heparin-Sepharose-Säule aufgereinigt wurde. Zwar war auch hier nur eine schwache Bindung zu beobachten, doch konnte diese durch Zugabe eines IE2-spezifischen Antikörpers zusätzlich stabilisiert werden (Huang und Chen, 2002). So könnte dies darauf hindeuten, dass die Bindungsfähigkeit des Proteins auch durch die Art der Aufreinigung wesentlich beeinflusst wird und die vermutlich schwache IE2-DNA-Interaktion leicht zerstört werden kann.

Ausgehend von den publizierten Studien wurde in dieser Arbeit ein DNA-Bindungsassay etabliert, der es ermöglicht, die Bindung des IE2 Proteins an die DNA relativ einfach nachzuweisen, unabhängig davon, ob das Protein von transient

transfizierten oder virus-infizierten Zellen stammte. Das hier entwickelte experimentelle Protokoll unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von früheren Assays.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall in einem Puffer mit geringem Salzgehalt, da sich gezeigt hat, dass dies für die Untersuchung der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren am günstigsten ist (Truss, 1992). Generell können durch Erhöhung der Salzkonzentration die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA abgeschwächt und die Affinität somit herabgesetzt werden. In der Regel werden Zellextrakte daher in der Gegenwart von 50-100 mM NaCl oder KCl hergestellt, um die Proteine während der Präparation von der DNA zu lösen. (Latchman). Da jedoch zu erwarten war, dass die IE2-DNA-Bindung eine eher geringe Affinität aufweist, wurde auf die Zugabe von Salzen im Probenpuffer verzichtet. Bei einer Präparation der Extrakte in einem Puffer mit geringem Salzgehalt bleibt zudem die Möglichkeit bestehen, in den Bindungsansätzen verschiedene Salze und Salzkonzentrationen auszutesten.

Durch die Zugabe nicht-spezifischer Proteine wie z.B. BSA kann die spezifische DNA-Interaktion stabilisieren werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das BSA die Adsorption der Proteine an die Oberflächen der Reaktionsgefäße und Gelplatten verhindert. Darüber hinaus beeinflusst es möglicherweise die Konformation der Proteine indem es die Anordnung der umgebenden Wassermoleküle verändert (Zhang et al., 1992). Auch im Falle des TBP, welches ebenfalls über Interaktionen mit der kleinen Furche an die DNA bindet, konnte so die DNA-Bindung verbessert werden (Jupp et al., 1993; Liebermann, 1991). Aus diesem Grunde wurden alle Bindungsansätze in der Gegenwart von 3 µg/µl BSA durchgeführt.

Im Gegensatz zu anderen Studien, war die in der vorliegenden Arbeit verwendete Targetduplex mit 60 Basenpaaren deutlich länger als üblich (Ahn et al., 1998; Chiou et al., 1993; Huang und Chen, 2002; Tsai et al., 1997; Waheed et al., 1998). Es ist möglich, dass eine längere Zielsequenz eher in der Lage ist, die Bindung des Proteins an die DNA zu stabilisieren, oder die DNA eine für die Bindung notwendige Struktur einnehmen kann. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund von Relevanz, dass das IE2-Protein Dimere bilden kann und vermutlich als Multimer an die crs bindet (Ahn et al., 1998; Lang und Stamminger, 1994; Waheed et al., 1998).

Ein Einfluss des Phosphorylierungsgrades des IE2 auf die DNA Bindungsfähigkeit konnte nicht beobachtet werden. Weder hatte die Zugabe von Alkalischer Phosphatase im Bindungsansatz einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Proteins (Abb. 10)

noch zeigte eine Mutante, bei der putative Phosphorylierungsstellen des IE2 mutiert sind, ein verändertes Bindungsverhalten (Abb. 20C). Eine durch die Phosphorylierung möglicherweise induzierte Konformationsänderung scheint daher die DNA-Bindungsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen.

Eine DNA-Bindung des IE2 Protein ist nur in Gegenwart von Magnesiumionen im Bindungsansatz beobachtet worden. Zweiwertige Kationen können die Protein-DNA-Bindung stabilisieren (Robidoux et al., 1992), da sie die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der DNA neutralisieren können und die DNA so alternative, für die Proteinbindung günstigere Konformationen eingehen kann.

Die Anwesenheit von Natriumchlorid im Bindungsansatz wirkte sich eher negativ aus, da es zum Auftreten unspezifischer Banden kam, während die spezifische Bande schwächer wurde. Offensichtlich kam es hier zu einer Schwächung der spezifischen Protein-DNA-Interaktion, während die Bindungsbedingungen für nichtspezifischen Proteine verbessert wurden.

Unter diesen optimierten Bindungsbedingungen konnte eine DNA-Bindung nicht nur mit Extrakten aus transfizierten Zellen, sondern erstmals auch mit Extrakten HCMV-infizierter Zellen nachgewiesen werden. Bei Verwendung von Zellextrakten aus transienten Transfektionen war bei den HeLa-Zellextrakten eine stärkere Komplexbildung zu beobachten als bei U373-Zellextrakten, was jedoch vermutlich auf die geringere Transfektionseffizienz in U373-Zellen zurückzuführen ist, die zu einer ca. 5-fach geringeren Expression des IE2-Proteins führte. Die DNA-Bindung des IE2-Proteins war sowohl in den nicht-permissiven wie auch in den HCMV-permissiven Zellen eindeutig nachzuweisen.

Im Rahmen der Virusinfektion konnte eine Komplexbildung an der *crs*-Zielsequenz nach 48 h beobachtet werden. Aufgrund der bisherigen Informationen über das Vermögen anderer IE2-Isoformen wie z.B. dem IE2p40 (Jenkins et al., 1994), den MIE Promotor zu reprimieren, ist zu vermuten, dass während der HCMV-Infektion auch andere Komplexe als reine IE2-Monomere an die DNA binden. Dafür spricht auch, dass die mit HCMV-Extrakten im Bandshift beobachtete Bande weniger distinkt war als bei Extrakten aus transienten Transfektionen. In der Immunoblotanalyse der Virusextrakte konnte zwischen 33 und 48 Stunden nach der Infektion ein deutlicher Anstieg in der Menge des *late* IE2p40-Proteins beobachtet werden. Auch bei der 55kDa-IE2-Variante

ist ein Anstieg zu verzeichnen, während die IE2-Menge nur gering zu nimmt. Da für die 55kDa-Variante bereits beschrieben ist, dass sie nicht in der Lage ist, den MIE Promotor zu reprimieren (Baracchini et al., 1992; Hermiston et al., 1990), ist nicht zu vermuten, dass sie an die DNA bindet. Wahrscheinlicher ist, dass das IE2p40-Protein, als Monomer oder im Komplex mit dem IE2-Protein, an der DNA-Bindung beteiligt ist. Allerdings müsste dies noch genauer untersucht werden. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass während der HCMV Infektion weitere virale Proteine die Protein-DNA-Interaktion stabilisieren können. Durch Zugabe eines IE-spezifischen Antikörpers konnte, wie auch schon bei den Extrakten transfizierter Zellen, die Bildung eines Supershifts induziert werden. Ein Antiserum, das gegen den C-Terminus des IE2-Proteins gerichtet ist, führte im Gegensatz dazu zu einer Inhibition der DNA-Bindung. Die biologische Relevanz der Autorepression ist noch nicht genau geklärt. Zwar konnte gezeigt werden, dass HCMV-Mutanten, in denen die *crs* mutiert ist, zu einen vorzeitigen Zelltod durch Apoptose führen, doch ist die genaue Ursache dieser Beobachtung noch unklar (Greaves, 2003). Mit dem nunmehr etablierten Bindungsassay wird es jedoch in Zukunft möglich sein, Fragestellungen zur IE2-*crs*-Interaktion während der Virusinfektion direkter zu bearbeiten.

2 *IE2-Struktur-Funktionsanalyse*

2.1 Der C-Terminus

In der vorliegenden Mutationsanalyse hat sich gezeigt, dass der C-Terminus des IE2-Proteins von besonderer Bedeutung für seine Funktionalität ist. In einem Bereich von Aminosäure 470 bis 544 überlappen die funktionellen Domänen der untersuchten Aktivitäten und führen schon kleine Mutationen zu erheblichen Funktionsverlusten. Dieser Bereich des Proteins scheint demnach eine Art funktionelle Kerndomäne („*Core*“) darzustellen. Die Struktur des *Core* ist vermutlich komplex und für die Funktionalität von großer Bedeutung, da schon kleinere AS-Austausche zu einer Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit führen. Die Ausdehnung dieser Domäne hat sich jedoch als deutlich geringer erwiesen als bisher vermutet.

Die äußersten C-terminalen Aminosäuren sind für die Zellzyklusarrestfunktion nicht erforderlich. Da die Mutante 1-544 noch in der Lage ist, einen Zellzyklusarrest zu induzieren, aber nicht mehr transaktiviert, autoreprimiert und DNA bindet, definiert dies

die C-terminale Grenze des *Core* (Abb. 23). Darüber hinaus zeigt diese Mutante, dass die Induktion des Zellzyklusarrests unabhängig von der Transaktivierungsfähigkeit des Proteins ist (bereits beschrieben in (Wiebusch und Hagemeier, 1999) sowie von einer Bindung an *crs*-ähnliche Sequenzen. Das *Core* erstreckt sich vermutlich noch bis zur Aminosäure 552, da beschrieben wurde, dass eine Mutante, bei der die letzten 28 Aminosäuren deletiert wurden (1-552) noch autoreguliert und DNA bindet, jedoch nicht mehr transaktivieren kann (Macias et al., 1996). Dies bedeutet, dass die äußersten C-terminalen Aminosäuren nur für die Transaktivierung benötigt werden und deckt sich damit, dass sie als Teil einer unabhängigen und übertragbaren Transaktivierungsdomäne identifiziert worden sind (Pizzorno et al., 1991). Somit scheinen sie eine funktionelle Domäne darzustellen, die von der Kerndomäne unabhängig ist.

Die Ausdehnung des *Core* in N-terminale Richtung wurde durch die internen Deletionsmutanten genauer definiert. Hierbei ergab sich, dass die N-terminale Grenze dieser Domäne vermutlich zwischen Aminosäure 450 und 470 liegt. Eine Mutante, die noch innerhalb der Kerndomäne liegt (del470) verhält sich wie die C-terminalen Aminosäure-Austauschmutanten und ist in ihrer Funktionsfähigkeit stark eingeschränkt. Die Mutante del430 hingegen zeigt in allen Assays nahezu Wildtyp-Aktivität, was bedeutet, dass die Aminosäuren 430-349 für die Funktionalität des Proteins nicht benötigt werden und somit außerhalb der Kerndomäne liegen.

Das *Core* wird demnach aus rund hundert Aminosäuren gebildet und scheint somit deutlich kleiner zu sein, als frühere Untersuchungen vermuten ließen (Chiou et al., 1993; Hermiston et al., 1990; Malone et al., 1990; Pizzorno et al., 1991; Stenberg et al., 1990).

Keine der Mutanten innerhalb des *Core* war in der Lage zu transaktivieren oder DNA zu binden und alle wiesen nur noch residuale Aktivität in Bezug auf den Zellzyklusarrest auf. Trotz der fehlenden DNA-Bindung wurde jedoch auch bei diesen Mutanten eine leichte Reduktion der Promotoraktivität des MIE Promotors beobachtet. Dies ist teilweise auch in der Literatur zu finden. Bei einigen, als bindungsinaktiv eingestuft Mutanten, ist im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen ebenfalls eine geringe Reduktion der Promotoraktivität beobachtet worden (Lashmit et al., 1998; Pizzorno et al., 1991). Wie diese Effekte zustande kommen, ist noch unklar. Da das IE2-Protein bekanntermaßen mit einer Vielzahl an Faktoren interagieren kann, kommt es möglicherweise durch die Anwesenheit auch eines bindungs-inaktiven IE2-Proteins

zur Konkurrenz um zelluläre Faktoren, die in den kontroll-transfizierten Zellen nicht auftritt. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass IE2 auch dann einen reprimierenden Effekt auf den Promotor ausüben kann, wenn es nicht direkt an die *crs* bindet, sondern lediglich mit anderen Faktoren am Promotor interagiert.

2.2 N-terminale Sequenzen

Die N-terminalen Sequenzen des IE2-Proteins wurden mittels interner Deletionen untersucht. Dieser Teil des Proteins scheint eine grundsätzlich andere Qualität zu besitzen als das C-terminale *Core*. Mutationen in dieser Region, also zwischen Aminosäure 230 und 450, hatten entweder gar keine oder nur selektiv Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit des IE2 Proteins. Dadurch war es möglich, einzelne Sequenzen zu identifizieren, die für bestimmte Funktionen erforderlich sind, für andere jedoch nicht. So führte die interne Deletion der Aminosäuren 260-279 zu einer Beeinträchtigung der Zellzyklusarrestaktivität und Transaktivierung, während die Autorepression unbeeinflusst war. Wurden die Aminosäuren 330-359 deletiert, so führte dies zu eingeschränkter Transaktivierung und DNA-Bindungsfähigkeit, doch blieben die Zellzyklusarrestfunktion sowie die Autorepression intakt. Sowohl die Mutante del260 als auch del330 zeigten bezüglich Transaktivierung eine residuale Aktivität von 30% bzw. 50% im Vergleich zum Wildtypprotein. Sie unterscheiden sich somit deutlich von Mutationen, die innerhalb des *Core* liegen, da diese zu einem vollständigen Funktionsverlust führten. Dies demonstriert die unterschiedlichen Qualitäten dieser beiden Bereiche im IE2-Protein. Während beim *Core* eine intakte Gesamtstruktur absolut essentiell ist, sind es im N-terminalen Teil des Proteins lediglich einzelne Bereiche, die in die Vermittlung einzelner Funktionen involviert sind und die sich somit auch als separate „Domänen“ untersuchen lassen.

Dadurch lassen sich hier auch Sequenzen identifizieren, die für die untersuchten Aktivitäten nicht benötigt werden. Dort, wo es zur Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit kam, war die Transaktivierung, der Zellzyklusarrest oder die DNA-Bindung betroffen. Im Gegensatz zum *Core* scheinen über die N-terminalen Sequenzen einzelne Aktivitäten spezifisch reguliert zu werden. Dieser Bereich stellt daher eine essentielle, spezifische Modulator-domäne (SEM) dar.

Die Mutante del330 liegt außerhalb des *Core* und zeigt einen partiellen Funktionsverlust. Sie ist in der Lage, einen Zellzyklusarrest zu induzieren und den MIE

Promotor zu reprimieren, doch kann sie nur noch eingeschränkt transaktivieren. Im DNA Bindungsassay wies diese Mutante nur eine minimale Bindungsfähigkeit auf. Allerdings konnte bei ihr im EMSA wiederholt eine schwache Bande beobachtet werden, die auf eine Komplexbindung zurückgeführt werden könnte. Diese diffuse Bande war von deutlich geringerer Intensität als die Banden, die beim Wildtyp und DNA-bindenden Mutanten beobachtet wurde. Allerdings war das schwache Signal nur bei der Mutante del330, nie aber bei nicht-bindenden Mutanten oder bei Kontrollextrakten zu beobachten. Die Frage ist nun, wie sich die Fähigkeit der Mutante del330, den MIE Promotor zu reprimieren, vor dem Hintergrund der so deutlich eingeschränkten DNA-Bindungsfähigkeit erklären lässt. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte die Interaktion des IE2 Proteins mit der *crs in vivo* durch Interaktion mit anderen zellulären Faktoren stabilisiert werden. Dies könnte eine eingeschränkte Bindungsfähigkeit ausgleichen und zu einer erfolgreichen Repression des Promotors führen. Unter den *in vitro* Bindungsbedingungen jedoch fehlt dann die Stabilisierung und reicht die residuale Bindungsfähigkeit nicht aus, um zu einer Komplexbildung zu führen.

Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* die DNA-Bindungsdomäne für die Autorepression gar nicht zwingend erforderlich ist, solange die *crs in cis* eine strukturelle Komponente beisteuert, die es ermöglicht, dass das IE2-Protein über Protein-Protein-Interaktionen an den Promotor rekrutiert wird. Die erstere Möglichkeit scheint jedoch wahrscheinlicher, zum einen aufgrund der beobachteten residualen Bindungsfähigkeit der Mutante del330, zum anderen, weil in den übrigen Fällen die Fähigkeit zur DNA-Bindung mit der zur Autorepression korrelierte, die direkte DNA-Bindung also durchaus für die Autorepression erforderlich zu sein scheint. Daher ist anzunehmen, dass die Aminosäuren 330-349 eine strukturelle Einheit darstellen, die vor allem für die Darstellung der DNA-Bindung *in vitro* eine limitierende Funktion besitzt. Dies ist insofern interessant als die Mutation del330-349 außerhalb der in früheren Untersuchungen identifizierten DNA-Bindungsdomäne liegt, die in Experimenten mit GST-Fusionsproteinen zwischen Aminosäure 346 und 579 lokalisiert wurde (Chiou et al., 1993). In einer anderen Studie, die die DNA-Bindung mittels eines *yeast-one-hybrid*-Assays untersuchte (Ahn et al., 1998), ist allerdings ebenfalls beobachtet worden, dass eine interne Deletion, die außerhalb der Bindungsdomäne liegt, nicht mehr an die DNA binden konnte. Bei der dort beschriebenen Mutation handelte es sich um die Deletion der Aminosäuren 313 bis 358, sie liegt also in der gleichen Region

wie die der hier verwendeten Mutante del330. In der Studie von Ahn et al. ist zudem beobachtet worden, dass eine interne Deletion der Sequenzen zwischen 313 und 358 zu einer höheren Dimerisierungsaktivität des Proteins führt, weshalb vermutet wurde, dass dieser Bereich eine Art Repressordomäne für die Dimerisierung darstellen könnte. Daher ist es möglich, dass Deletionen im Bereich zwischen Aminosäure 313 bis 346, also auch im Bereich unserer Mutante del330, die Bildung größerer monomerer Komplexe fördern und dies die *in vitro* DNA Bindung behindert.

Die Deletion del260-289 ist die zweite Mutation außerhalb der Kerndomäne, die zu einem Funktionsverlust führte. Die Mutante del260 kann nur noch schwach transaktivieren und einen Zellzyklusarrest induzieren. Ihre Fähigkeit, den MIE Promotor zu reprimieren ist hingegen nicht beeinträchtigt.

Die Mutation der del260 liegt in einem Bereich des Proteins, der stark phosphoryliert wird (Harel und Alwine, 1998). An dieser Stelle unterscheiden sich auch die beiden IE2-Varianten. Während das IE2 aus dem AD169 Stamm an dieser Stelle 8 aufeinanderfolgende Serinreste enthält, sind es bei dem Town IE2 nur 7. Das zusätzliche Serin ist mit einer stärkeren Transaktivierungsfähigkeit in Verbindung gebracht worden (Barrasa et al., 2003). Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine nahezu komplette Deletion dieser Serine einen Einfluss auf die Transaktivierungsfähigkeit hat. Darüber hinaus ist dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit früheren Studien, die bei einer internen Deletionsmutante (Δ 136-290) ebenfalls eine Reduktion der Transaktivierung beobachtet haben (Hofmann et al., 2000; Sommer et al., 1994). Die Deletion der Aminosäuren 260–289 beeinflusst auch die Zellzyklusaktivität des Proteins. Dies ist etwas unerwartet, da eine Mutante mit einer größeren internen Deletion (Δ 136-290) noch in der Lage ist, einen Zellzyklus zu induzieren (Wiebusch und Hagemeier, 1999). Möglicherweise hat die Deletion der Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die Konformation des Proteins an dieser Stelle, der sich dominant-negativ auf die Zellzyklusarrestaktivität auswirkt, während die Deletion der gesamten Region (Δ 136-290) keine Auswirkungen auf diese Funktion hat. Dass gerade die an der Phosphorylierung des Proteins beteiligten Aminosäuren einen Einfluss auf seine Konformation ausüben können, ist auch von auch Harel et al. beschrieben worden. Die Mutation zweier potentieller Phosphorylierungsstellen an Position 233 und 234 hatte umfangreiche Auswirkungen auf die Phosphorylierung und Konformation des gesamten Proteins (Harel und Alwine, 1998). Dies könnte auch bei

der Mutante del260 der Fall sein. Allerdings scheint das *Core* bei dieser Mutante noch intakt zu sein, da sie in Bezug auf die Autorepression noch Wildtypaktivität zeigt.

2.3 Die postulierte Zinkfingerdomäne

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur DNA-Bindung des IE2-Proteins, ist das eigentliche DNA-bindende Proteinmotiv noch unbekannt. IE2 weist keine Homologien zu anderen bekannten DNA-bindenden Proteinen auf und kann daher bisher keiner bestimmten Klasse zugeordnet werden. Jedoch wurde bisher der postulierten Zinkfingerdomäne im C-Terminus des Proteins eine besondere Bedeutung für die DNA Bindung und Autorepression zugeschrieben.

Ein Ausgangspunkt hierfür war die Feststellung, dass die verschiedenen IE2-Isoformen nicht alle in der Lage sind, den MIE Promotor zu reprimieren. Das durch die Transkription von einem internen Promotor gebildete late IE2p40-Protein besteht aus den Aminosäuren 242 bis 579. Es kann den MIE Promotor reprimieren und somit vermutlich an die DNA binden (Jenkins et al., 1994). Im Gegensatz dazu ist das IE55 nicht mehr zur Autorepression in der Lage und vermittelt im Gegenteil eine Aktivierung des Promotors (Baracchini et al., 1992). Dem IE55 fehlen im Vergleich zum Wildtyp Protein die Aminosäuren 365-519, innerhalb derer sich der postulierte Zinkfinger sowie eine Leucin-reiche Region befinden. Dieser singuläre Cystein-Histidin-Zinkfinger ist bisher nur aufgrund seiner Primärsequenz mittels Mutationsanalysen untersucht worden, bei denen entweder die Cysteine des Zinkfingers durch Serine oder die Histidine durch Leucine ersetzt wurden (Jupp et al., 1993; Macias und Stinski, 1993; Yeung et al., 1993). Ein funktioneller Nachweis der Abhängigkeit der DNA-Bindung von anwesenden Zinkionen erfolgte bisher jedoch nicht.

Keine der genannten Zinkfingermutanten ist mehr in der Lage, den MIE Promotor zu reprimieren oder an die DNA zu binden (Bresnahan et al., 1998; Jupp et al., 1993; Macias und Stinski, 1993; Yeung et al., 1993). Allerdings gibt es unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Transaktivierungsfähigkeit dieser Mutanten. Während in einer Untersuchung keine der beiden Mutanten in der Lage war, den HIV LTR-Promotor zu aktivieren (Yeung et al., 1993) wurde in zwei anderen beschrieben, dass die Cysteinmutante den MIE Promotor aktiviert, statt ihn zu reprimieren und auch zu einer leichten Aktivierung des SV40 Promotors führte (Bresnahan et al., 1998; Jupp et al., 1993). In der hier verwendeten Mutante del430 ist der Zinkfinger nahezu komplett

deletiert. Dennoch ist diese Mutante in der Lage, zu autoregulieren und DNA zu binden und transaktiviert sowohl den UL112/113 als auch den c-fos Promotor. Bei einer parallelen Untersuchung der del430 mit einer publizierten Zinkfingermutante verhielten sich beide Mutanten erwartungsgemäß, d.h. die Mutante del430 konnte an die DNA binden, die Zinkfingermutante jedoch nicht. Daraus lässt sich zweierlei schlussfolgern. Zum einen scheint der Zinkfinger *per se* als DNA-bindendes Motiv nicht notwendig zu sein. Zum anderen wird deutlich, dass die beiden untersuchten Mutationen, nämlich die Deletion der AS 430 bis 449 und die Punktmutation der beiden Histidine in ihrer Auswirkung nicht gleichwertig sind. Die Punktmutation des Zinkfingers scheint vielmehr einen dominant-negativen Effekt auf die Struktur des C-Terminus haben, der dann einen Funktionsverlust zur Folge hat. Jupp et al. berichteten, dass die Zinkfingermutante den MIE Promotor aktiviert, und folgerten dementsprechend, dass der C-Terminus noch intakt sein müsse. Da aber in einer Studie von Yeung et al. keine der beiden Zinkfingermutanten in der Lage war, den HIV LTR-Promotor zu aktivieren (Yeung et al., 1993), lässt sich nicht eindeutig sagen, ob der C-Terminus in diesen Mutanten noch intakt ist oder ob durch die Einfügung der Punktmutationen seine Struktur zerstört wurde. Eigene Beobachtungen haben gezeigt, dass die Zinkfingermutante auch den UL112/113-Promotor nicht mehr aktivieren kann. Die Ergebnisse der Mutante del430 sprechen daher dafür, dass der Zinkfinger als solcher kein essentielles DNA-Bindungsmotif darstellt, seine Zerstörung durch Punktmutationen aber einen dominant-negativen Effekt auf die Funktionsfähigkeit ausüben kann.

Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass das Zinkfingermotiv zwischen verschiedenen CMV-Spezies nicht konserviert ist. Bei einem Sequenzvergleich an dieser Stelle fällt auf, dass bereits bei dem IE2 aus Simian CMV anstelle des ersten Cycteins ein Isoleucin vorhanden ist (Barrasa et al., 2003; Chiou et al., 1993). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass sowohl der Simian MIE Promotor durch das IE2 des HCMV als auch der humane MIE Promotor durch das Simian IE2-Protein reprimiert werden kann und somit die *cis*- wie auch die *trans*- agierenden Elemente in beiden Spezies konserviert zu sein scheinen (Pizzorno und Hayward, 1990).

3 *Aufbau und Lokalisation der regulatorischen Domänen des IE2-Proteins*

Die Ergebnisse unserer Analysen ergeben ein neues Bild vom funktionellen Aufbau des IE2-Proteins. Ein entsprechendes Schema des IE2 und seiner regulatorischen Domänen ist in Abbildung 23 dargestellt.

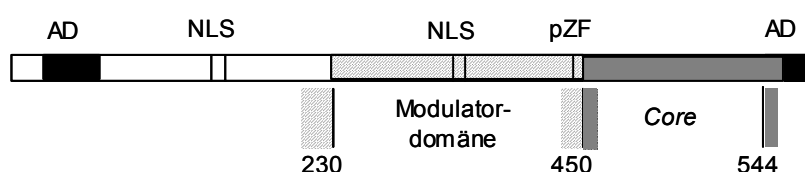


Abb. 23: Funktionelle Domänen im HCMV IE2-Protein.

Der C-Terminus des IE2-Proteins bildet eine komplexe Kerndomäne („Core“), die hauptsächlich an der Vermittlung der Zellzyklusarrest-Aktivität, der Transaktivierung sowie der Autoregulation und DNA-Bindung beteiligt ist. Die N-terminale Grenze dieser Domäne liegt zwischen AS 450 und 470, C-terminal reicht sie vermutlich bis zur Aminosäure 552 (siehe Erläuterungen im Text). Die äußersten C-terminalen Aminosäuren werden nur für die Transaktivierung benötigt. An das Core schließt sich eine spezifische, essentielle Modulordomäne (SEM) an. Sie ist ebenfalls essentiell für die Funktionsfähigkeit des Proteins, aber deutlich weniger sensitiv gegenüber Mutationen. Innerhalb dieser Region können Sequenzen identifiziert werden, die an der Vermittlung einzelner Funktionen beteiligt sind. Die N-terminale Grenze der Modulordomäne ist noch unklar. Die äußersten N-terminalen Sequenzen enthalten eine weitere unabhängige Aktivierungsdomäne (AS 25-85). Für den Zellzyklus, die Autoregulation und die DNA-Bindung werden die ersten 195 Aminosäuren (1-195) jedoch nicht benötigt. Der putative Zinkfinger (pZF) liegt außerhalb der Kerndomäne und stellt kein essentielles DNA-Bindungselement dar. (NLS- Nuclear Localization Signal, AD- Aktivierungsdomäne)

Innerhalb einer komplexen Kerndomäne, dem Core, im C-Terminus des Proteins (AS 450–544) überlappen die funktionellen Domänen für den Zellzyklusarrest, die Transaktivierung, die Autoregulation und DNA-Bindung. Mutationen innerhalb des Core haben globale Auswirkungen und führen zu dramatischen Funktionsverlusten. Dies lässt vermuten, dass die Struktur des Proteins an dieser Stelle komplex ist. Die Grenze des Core liegt N-terminal zwischen AS 450 und 470, auf C-terminaler Seite vermutlich bei AS 552 (Macias et al., 1996). Die äußersten C-terminalen Aminosäuren bilden eine unabhängige Aktivierungsdomäne, die ausschließlich für die

Transaktivierung benötigt wird (Pizzorno et al., 1991). Die putative Zinkfingerdomäne liegt außerhalb der Kerndomäne und scheint für die Funktionsfähigkeit des Proteins nicht benötigt zu werden.

In N-terminaler Richtung schließt sich an die Kerndomäne eine Art spezifische Modulator-domäne an. Auch diese Domäne ist, wie die Kerndomäne, essentiell für die Funktionalität des Proteins, denn keine der untersuchten Aktivitäten kann alleine durch die Kerndomäne vermittelt werden. Allerdings ist innerhalb der Modulator-domäne ein niedrigerer Grad der Überlappung funktioneller Domänen zu beobachten. Darüber hinaus enthält sie zahlreiche nicht-essentielle Abschnitte. So konnten durch Mutationen Bereiche identifiziert werden, die für nur bestimmte Funktionen benötigt werden. Darüber hinaus ist die Modulator-domäne insgesamt weniger sensitiv gegenüber Mutationen, was auf eine weniger komplexe Struktur hinweisen könnte. Keine der Mutationen innerhalb dieser Domäne führt zu einem vollständigen Funktionsverlust bezüglich der untersuchten Aktivitäten. Die Grenze der Modulator-domäne in N-terminaler Richtung ist noch unklar. Vermutlich liegt sie zwischen Aminosäure 195 und 290, da für die N-terminalen Aminosäuren bereits beschrieben ist, dass sie für die Autorepression und DNA-Bindung sowie für die Zellzyklusarrestinduktion nicht erforderlich sind (Chiou et al., 1993; Pizzorno und Hayward, 1990; Pizzorno et al., 1991; Wiebusch und Hagemeier, 1999). Lediglich die Transaktivierung ist auf den N-Terminus angewiesen, da sich auch hier eine unabhängige, azide Aktivierungsdomäne (AS25-85) befindet (Pizzorno et al., 1991).

Die Beobachtung, dass die Kerndomäne nur ca. 100 Aminosäuren umfasst und die Modulator-domäne zahlreiche nicht-essentielle Abschnitte enthält, steht im Gegensatz zu publizierten Studien, die gezeigt haben, dass vor allem die Fähigkeit zur Autoregulation und DNA-Bindung schon durch kleine Mutationen in dem Bereich zwischen Aminosäure 290 und 470 verloren geht (Ahn et al., 1998; Waheed et al., 1998). In unserer Untersuchung jedoch waren alle internen Deletionsmutanten, bis auf die del470, noch in der Lage, den MIE Promotor zu reprimieren, was an zwei verschiedenen Promotorkonstrukten demonstriert wurde. Darüber hinaus konnten wir auch die direkte DNA-Bindung dieser Mutanten nachweisen.

Für die unterschiedlichen Ergebnisse können mehrere Faktoren verantwortlich sein. Ein wichtiger Aspekt ist der Einfluss des jeweils verwendeten experimentellen Systems. So

wurden alle Experimente dieser Arbeit in HCMV-permissiven U373-Zellen oder HeLa-Zellen durchgeführt, während in den anderen Studien nicht-permissive Vero-Zellen zum Einsatz kamen, bei denen es sich um Affen-Nierenzellen handelt (Ahn et al., 1998; Waheed et al., 1998).

Darüber hinaus benutzten Waheed et al. und Ahn et al. für die DNA Bindungsassays GST-Fusionsproteine, die lediglich den C-Terminus des IE2-Proteins enthielten, verwendet oder exprimierten das IE2 als Fusionsprotein in Hefen. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die verschiedenen experimentellen Systeme hinsichtlich vorhandener Co-Faktoren und eventuell auch in Bezug auf posttranslationale Modifikationen unterscheiden und dies die Ergebnisse beeinflusst.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Verwendung unterschiedlicher IE2-Varianten. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem IE2 des HCMV AD169 Stammes gearbeitet, während in den anderen das IE2 des HCMV Town Stammes zum Einsatz kam. Die Aminosäuresequenzen dieser beiden IE2-Varianten unterscheiden sich an vier Positionen. Es gibt drei Aminosäure-Austausche (R68Q, K455E, und T541A) [die Aminosäureposition bezieht sich hier auf das IE2 des Town Stammes] und im Bereich zwischen Aminosäure 258 und 264 befinden sich bei dem IE2 des Town Stammes 7, beim IE2 aus AD169 8 aufeinanderfolgende Serine. Das IE2 des AD169 besitzt demnach eine zusätzliche Aminosäure. In einer aktuellen Studie, in der der Einfluss verschiedener Sequenzunterschiede auf die Funktionsfähigkeit untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass das IE2 aus dem AD169 Stamm insgesamt aktiver in Bezug auf die Transaktivierung ist (Barrasa et al., 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass dies auch auf die Autorepression und den Zellzyklusarrest zutrifft.

Abschließend ist anzumerken, dass innerhalb der Modulatordomäne möglicherweise weitere Sequenzen identifiziert werden können, die für die Funktionalität des Proteins benötigt werden, die aber in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert wurden. Wesentlich ist jedoch, dass mit der Modulator- und der Kerndomäne im IE2 Protein zwei Bereiche von unterschiedlicher Qualität identifiziert worden sind und nur innerhalb der Kerndomäne Mutationen zu einem vollständigen Funktionsverlust führten.

Was bedeutet dies für die eingangs dargestellte Zielsetzung und Fragestellung? Für die Untersuchung einzelner Funktionen im viralen Kontext ist es notwendig, diese gezielt und möglichst vollständig ausschalten zu können. Da nur Mutationen innerhalb der Kerndomäne zu einem absoluten Funktionsverlust führten, qualifiziert vor allem sie sich für weitergehende Untersuchungen. Um zwischen den einzelnen IE2-Funktionen diskriminierende Mutanten zu entwickeln, ist es sinnvoll, diese rund hundert Aminosäuren umfassende Domäne mittels feinerer Mutationen systematisch zu analysieren. Aufgrund der naheliegenden Annahme, dass den verschiedenen Funktionen unterschiedliche Mechanismen und auch unterschiedliche Sequenzanforderungen zugrunde liegen, sollte eine solche Mutationsanalyse die dringend benötigten Mutationen identifizieren, mit denen dann die physiologische Relevanz einzelner IE2-Funktionen im viralen Hintergrund *in vivo* analysiert werden könnte.

V. Zusammenfassung

Das *Immediate Early* Protein 2 (IE2) des humanen Zytomegalievirus (HCMV) ist ein essentieller Regulationsfaktor innerhalb des viralen Infektionszyklus. Es aktiviert verschiedene frühe Promotoren und reguliert seine eigene Expression über Bindung an den MIE Promotor. Darüber hinaus aktiviert es zellzyklusstimulatorische Signalwege, führt aber letztendlich zu einem Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang.

Aufgrund seiner zentralen Bedeutung für die virale Replikation und der zahlreichen Funktionen, die es erfüllt, ist eine genaue Kenntnis der regulatorischen Proteindomänen innerhalb des IE2 Proteins unabdingbar, um einzelne Funktionen gezielt manipulieren und ihre physiologische Bedeutung analysieren zu können.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde deshalb eine Struktur-Funktionsanalyse des IE2 Proteins durchgeführt. Ziel der Analyse war es, eine strukturelle Systematik für die unterschiedlichen IE2-Funktionen zu erstellen. So sollten funktionelle Domänen des IE2 Proteins definiert und untersucht werden, inwieweit diese Domänen überlappen oder strukturell unabhängig sind. Da auch die DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins in diese Studien einbezogen werden sollte, musste zunächst ein adäquater Bindungsassay etabliert werden.

Im Rahmen dieser Analysen wurde der Einfluss verschiedener Mutationen in IE2 auf den Zellzyklus transfizierter HCMV-permissiver U373-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde die Transaktivierungsfähigkeit sowie ihre Autorepressorfunktion in Reporterassays bestimmt. Zur Analyse der DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins wurde ein DNA-Bindungsassay etabliert, der es erstmals ermöglicht, die Bindung des IE2 Protein mit Hilfe von Extrakten transfizierter und auch HCMV-infizierter Zellen direkt zu analysieren.

Die Untersuchungen haben ergeben, dass innerhalb einer Kerndomäne („*Core*“) im C-Terminus des Proteins (AS 450–544) die regulatorischen Domänen der oben aufgeführten Funktionen überlappen. Selbst kleinere Mutationen des *Core* führen zu einem drastischen Funktionsverlust aller untersuchten Aktivitäten. Da selbst unterschiedliche Mutationen den gleichen Effekt hatten, ist zu vermuten, dass das IE2 Protein innerhalb des *Core* eine komplexe Struktur besitzt, deren Integrität für die Funktionsfähigkeit von IE2 absolut notwendig ist. Die äußersten C-terminalen Aminosäuren hingegen scheinen nur für die Transaktivierung benötigt zu werden, was

sich damit deckt, dass sie als Teil einer unabhängigen Transaktivierungsdomäne identifiziert worden sind. Die Fähigkeit von IE2 zur Induktion eines Zellzyklusarrests ist nicht nur unabhängig von der Transaktivierungsfähigkeit des Proteins sondern auch von seiner DNA-Bindungsfähigkeit.

N-terminal der Kerndomäne kann eine Domäne mit ganz anderen Charakteristika deutlich abgegrenzt werden, die „Modulator-domäne“. Zwar ist sie ebenso notwendig für die Funktionsfähigkeit des Proteins wie das *Core*, d.h. weder das *Core* noch die Modulator-domäne können unabhängig voneinander funktionieren, doch scheinen in diesem Bereich die funktionellen Domänen nicht mehr vollständig zu überlappen. Vielmehr lassen sich einzelne Domänen identifizieren, die nur für bestimmte Funktionen erforderlich sind. Die Modulator-domäne erstreckt sich von Aminosäure 290 bis 450, wobei die N-terminale Grenze der Domäne bisher nicht hinreichend evaluiert worden ist. Ein Großteil der Mutanten innerhalb der Modulator-domäne zeigte Wildtypaktivität. Nur zwei dieser Deletionsmutanten wiesen eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit auf. Während del330 nur residual transaktivieren und *in vitro* DNA binden konnte, zeigte del260 Funktionsverluste bezüglich Zellzyklusarrestinduktion und Transaktivierung. Die Modulator-domäne ist insgesamt somit deutlich weniger sensibel gegenüber Mutationen, was darauf hindeuten könnte, dass hier auch die Struktur des Proteins weniger komplex ist. Auffallend war zudem, dass keine der analysierten Mutationen zum Verlust bestimmter Funktionen von IE2 geführt hat.

Eine weitere interne Deletionsmutante del430-459 zeigte, dass eine im bisherigen Verständnis zentrale Region mit einer putativen Zinkfingerdomäne für die DNA-Bindung *per se* nicht benötigt wird.

Es lässt sich schlussfolgern, dass IE2 ein komplexes *Core* von ca. 100 Aminosäuren besitzt, in dem alle Funktionen von einer komplexen, überlappenden Struktur abhängig sind. Jede Mutation führt hier zum kompletten Funktionsverlust von IE2. Im Gegensatz dazu hat die N-terminal angrenzende Domäne eher modulierenden Charakter und es konnte keine Mutation identifiziert werden, die eine Funktion von IE2 komplett ausschaltete. Für die weiterführende Analyse der unterschiedlichen Funktionen von IE2 ist deshalb eine hochauflösende systematische Mutationsanalyse des *Core* angezeigt. So sollte es gelingen, diskriminierende Mutanten von IE2 zu definieren, die dann im Viruskontext auf die physiologische Bedeutung definierter IE2-Funktionen getestet werden können.

VI. Literatur

- Ahn, J. H.; Chiou, C. J. und Hayward, G. S. (1998): Evaluation and mapping of the DNA binding and oligomerization domains of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus using yeast one and two hybrid interaction assays, *Gene* 210 [1], Seite 25-36.
- Ahn, J. H. und Hayward, G. S. (2000): Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection, *Virology* 274 [1], Seite 39-55.
- Ahn, J. H.; Jang, W. J. und Hayward, G. S. (1999): The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10), *J Virol* 73 [12], Seite 10458-71.
- Ahn, J. H.; Xu, Y.; Jang, W. J.; Matunis, M. J. und Hayward, G. S. (2001): Evaluation of interactions of human cytomegalovirus immediate-early IE2 regulatory protein with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9, *J Virol* 75 [8], Seite 3859-72.
- Anders, D. G.; Kacica, M. A.; Pari, G. und Punturieri, S. M. (1992): Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication, *J Virol* 66 [6], Seite 3373-84.
- Anders, D. G. und McCue, L. A. (1996): The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis, *Intervirology* 39 [5-6], Seite 378-88.
- Arlt, H.; Lang, D.; Gebert, S. und Stamminger, T. (1994): Identification of binding sites for the 86-kilodalton IE2 protein of human cytomegalovirus within an IE2-responsive viral early promoter, *J Virol* 68 [7], Seite 4117-25.
- Bain, M.; Mendelson, M. und Sinclair, J. (2003): Ets-2 Repressor Factor (ERF) mediates repression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter in undifferentiated non-permissive cells, *J Gen Virol* 84 [Pt 1], Seite 41-9.
- Banks, T. A. und Rouse, B. T. (1992): Herpesviruses--immune escape artists?, *Clin Infect Dis* 14 [4], Seite 933-41.
- Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1996): The CBP co-activator is a histone acetyltransferase, *Nature* 384 [6610], Seite 641-3.
- Baracchini, E.; Glezer, E.; Fish, K.; Stenberg, R. M.; Nelson, J. A. und Ghazal, P. (1992): An isoform variant of the cytomegalovirus immediate-early auto repressor functions as a transcriptional activator, *Virology* 188 [2], Seite 518-29.
- Barrasa, M. I.; Harel, N.; Yu, Y. und Alwine, J. C. (2003): Strain variations in single amino acids of the 86-kilodalton human cytomegalovirus major immediate-early

- protein (IE2) affect its functional and biochemical properties: implications of dynamic protein conformation, *J Virol* 77 [8], Seite 4760-72.
- Benson, J. D. und Huang, E. S. (1988): Two specific topoisomerase II inhibitors prevent replication of human cytomegalovirus DNA: an implied role in replication of the viral genome, *J Virol* 62 [12], Seite 4797-800.
- Benson, J. D. und Huang, E. S. (1990): Human cytomegalovirus induces expression of cellular topoisomerase II, *J Virol* 64 [1], Seite 9-15.
- Biegalka, B. J. (1995): Regulation of human cytomegalovirus US3 gene transcription by a cis-repressive sequence, *J Virol* 69 [9], Seite 5362-7.
- Biswas, N.; Sanchez, V. und Spector, D. H. (2003): Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication, *J Virol* 77 [4], Seite 2369-76.
- Boldogh, I.; AbuBakar, S. und Albrecht, T. (1990): Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection, *Science* 247 [4942], Seite 561-4.
- Bonin, L. R. und McDougall, J. K. (1997): Human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein binds p53 but does not abrogate G1 checkpoint function, *J Virol* 71 [8], Seite 5861-70.
- Boshart, M.; Weber, F.; Jahn, G.; Dorsch-Hasler, K.; Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus, *Cell* 41 [2], Seite 521-30.
- Bresnahan, W. A.; Albrecht, T. und Thompson, E. A. (1998): The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa immediate early protein, *J Biol Chem* 273 [34], Seite 22075-82.
- Bresnahan, W. A.; Boldogh, I.; Chi, P.; Thompson, E. A. und Albrecht, T. (1997): Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication, *Virology* 231 [2], Seite 239-47.
- Bresnahan, W. A.; Boldogh, I.; Thompson, E. A. und Albrecht, T. (1996): Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1, *Virology* 224 [1], Seite 150-60.
- Bresnahan, W. A. und Shenk, T. (2000): A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles, *Science* 288 [5475], Seite 2373-6.
- Britt, W. J. und Mach, M. (1996): Human cytomegalovirus glycoproteins, *Intervirology* 39 [5-6], Seite 401-12.
- Bryant, L. A.; Mixon, P.; Davidson, M.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. und Sinclair, J. H. (2000): The human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein interacts physically and functionally with histone acetyltransferase P/CAF, *J Virol* 74 [16], Seite 7230-7.

- Buerger, I.; Reefschlaeger, J.; Bender, W.; Eckenberg, P.; Popp, A.; Weber, O.; Graeper, S.; Klenk, H. D.; Ruebsamen-Waigmann, H. und Hallenberger, S. (2001): A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products, *J Virol* 75 [19], Seite 9077-86.
- Cameron, J. M. und Preston, C. M. (1981): Comparison of the immediate early polypeptides of human cytomegalovirus isolates, *J Gen Virol* 54 [Pt 2], Seite 421-4.
- Castillo, J. P.; Yurochko, A. D. und Kowalik, T. F. (2000): Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control, *J Virol* 74 [17], Seite 8028-37.
- Caswell, R.; Hagemeyer, C.; Chiou, C. J.; Hayward, G.; Kouzarides, T. und Sinclair, J. (1993): The human cytomegalovirus 86K immediate early (IE) 2 protein requires the basic region of the TATA-box binding protein (TBP) for binding, and interacts with TBP and transcription factor TFIIB via regions of IE2 required for transcriptional regulation, *J Gen Virol* 74 [Pt 12], Seite 2691-8.
- Chee, M. S.; Bankier, A. T.; Beck, S.; Bohni, R.; Brown, C. M.; Cerny, R.; Horsnell, T.; Hutchison, C. A., 3rd; Kouzarides, T.; Martignetti, J. A. und et al. (1990): Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169, *Curr Top Microbiol Immunol* 154, Seite 125-69.
- Chen C. , Okayama H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA., *Mol Cell Biol* 7, Seite 2745-2752.
- Cherrington, J. M.; Fuller, M. D.; Lamy, P. D.; Miner, R.; Lalezari, J. P.; Nuesse, S. und Drew, W. L. (1998): In vitro antiviral susceptibilities of isolates from cytomegalovirus retinitis patients receiving first- or second-line cidofovir therapy: relationship to clinical outcome, *J Infect Dis* 178 [6], Seite 1821-5.
- Cherrington, J. M.; Khoury, E. L. und Mocarski, E. S. (1991): Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site, *J Virol* 65 [2], Seite 887-96.
- Cherrington, J. M. und Mocarski, E. S. (1989): Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element, *J Virol* 63 [3], Seite 1435-40.
- Chiou, C. J.; Zong, J.; Waheed, I. und Hayward, G. S. (1993): Identification and mapping of dimerization and DNA-binding domains in the C terminus of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus, *J Virol* 67 [10], Seite 6201-14.
- Cinatl, J., Jr.; Kotchetkov, R.; Weimer, E.; Blaheta, R. A.; Scholz, M.; Vogel, J. U.; Gumbel, H. O. und Doerr, H. W. (2000): The antisense oligonucleotide ISIS 2922 prevents cytomegalovirus-induced upregulation of IL-8 and ICAM-1 in cultured human fibroblasts, *J Med Virol* 60 [3], Seite 313-23.

- Colberg-Poley, A. M. (1996): Functional roles of immediate early proteins encoded by the human cytomegalovirus UL36-38, UL115-119, TRS1/IRS1 and US3 loci, *Intervirology* 39 [5-6], Seite 350-60.
- Colberg-Poley, A. M. und Santomenna, L. D. (1988): Selective induction of chromosomal gene expression by human cytomegalovirus, *Virology* 166 [1], Seite 217-28.
- Colberg-Poley, A. M.; Santomenna, L. D.; Harlow, P. P.; Benfield, P. A. und Tenney, D. J. (1992): Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression, *J Virol* 66 [1], Seite 95-105.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. (1991): *Current protocols in immunology*, John Wiley & Sons, New York.
- Davison, A. J.; Dolan, A.; Akter, P.; Addison, C.; Dargan, D. J.; Alcendor, D. J.; McGeoch, D. J. und Hayward, G. S. (2003): The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome, *J Gen Virol* 84 [Pt 1], Seite 17-28.
- de Smet, M. D.; Meenken, C. J. und van den Horn, G. J. (1999): Fomivirsen - a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis, *Ocul Immunol Inflamm* 7 [3-4], Seite 189-98.
- Depto, A. S. und Stenberg, R. M. (1989): Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products, *J Virol* 63 [3], Seite 1232-8.
- Dittmer, D. und Mocarski, E. S. (1997): Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition, *J Virol* 71 [2], Seite 1629-34.
- Fortunato, E. A.; McElroy, A. K.; Sanchez, I. und Spector, D. H. (2000): Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus, *Trends Microbiol* 8 [3], Seite 111-9.
- Fortunato, E. A.; Sanchez, V.; Yen, J. Y. und Spector, D. H. (2002): Infection of cells with human cytomegalovirus during S phase results in a blockade to immediate-early gene expression that can be overcome by inhibition of the proteasome, *J Virol* 76 [11], Seite 5369-79.
- Fortunato, E. A.; Sommer, M. H.; Yoder, K. und Spector, D. H. (1997): Identification of domains within the human cytomegalovirus major immediate-early 86-kilodalton protein and the retinoblastoma protein required for physical and functional interaction with each other, *J Virol* 71 [11], Seite 8176-85.
- Fowler, K. B. und Pass, R. F. (1995): Cytomegalovirus infection as a cause of hearing loss among children, *Am J Public Health* 85 [5], Seite 734-5.
- Fowler, K. B.; Stagno, S.; Pass, R. F.; Britt, W. J.; Boll, T. J. und Alford, C. A. (1992): The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status, *N Engl J Med* 326 [10], Seite 663-7.

- Gawn, J. M. und Greaves, R. F. (2002): Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression, *J Virol* 76 [9], Seite 4441-55.
- Gebert, S.; Schmolke, S.; Sorg, G.; Floss, S.; Plachter, B. und Stamminger, T. (1997): The UL84 protein of human cytomegalovirus acts as a transdominant inhibitor of immediate-early-mediated transactivation that is able to prevent viral replication, *J Virol* 71 [9], Seite 7048-60.
- Gibson, W. (1981): Immediate-early proteins of human cytomegalovirus strains AD 169, Davis, and Towne differ in electrophoretic mobility, *Virology* 112 [1], Seite 350-4.
- Gibson, W. (1996): Structure and assembly of the virion, *Intervirology* 39 [5-6], Seite 389-400.
- Greaves, R. F. (2003): Regulatory mutants of HCMV that influence cell death alter the expression of the UL37 anti-apoptotic gene, 9th International Cytomegalovirus Workshop and 1st International Betaherpesvirus Workshop, Maastricht, the Netherlands.
- Greaves, R. F. und Mocarski, E. S. (1998): Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant, *J Virol* 72 [1], Seite 366-79.
- Greijer, A. E.; Dekkers, C. A. und Middeldorp, J. M. (2000): Human cytomegalovirus virions differentially incorporate viral and host cell RNA during the assembly process, *J Virol* 74 [19], Seite 9078-82.
- Hagemeier, C.; Caswell, R.; Hayhurst, G.; Sinclair, J. und Kouzarides, T. (1994): Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein, *Embo J* 13 [12], Seite 2897-903.
- Hagemeier, C.; Walker, S.; Caswell, R.; Kouzarides, T. und Sinclair, J. (1992): The human cytomegalovirus 80-kilodalton but not the 72-kilodalton immediate-early protein transactivates heterologous promoters in a TATA box-dependent mechanism and interacts directly with TFIID, *J Virol* 66 [7], Seite 4452-6.
- Hagemeier, C.; Walker, S. M.; Sissons, P. J. und Sinclair, J. H. (1992): The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements, *J Gen Virol* 73 [Pt 9], Seite 2385-93.
- Hahn, G.; Jores, R. und Mocarski, E. S. (1998): Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [7], Seite 3937-42.
- Harel, N. Y. und Alwine, J. C. (1998): Phosphorylation of the human cytomegalovirus 86-kilodalton immediate-early protein IE2, *J Virol* 72 [7], Seite 5481-92.
- Hayashi, M. L.; Blankenship, C. und Shenk, T. (2000): Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [6], Seite 2692-6.

- Hebbes, T. R.; Thorne, A. W. und Crane-Robinson, C. (1988): A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin, *Embo J* 7 [5], Seite 1395-402.
- Heider, J. A.; Bresnahan, W. A. und Shenk, T. E. (2002): Construction of a rationally designed human cytomegalovirus variant encoding a temperature-sensitive immediate-early 2 protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [5], Seite 3141-6.
- Heider, J. A.; Yu, Y.; Shenk, T. und Alwine, J. C. (2002): Characterization of a human cytomegalovirus with phosphorylation site mutations in the immediate-early 2 protein, *J Virol* 76 [2], Seite 928-32.
- Hermiston, T. W.; Malone, C. L. und Stinski, M. F. (1990): Human cytomegalovirus immediate-early two protein region involved in negative regulation of the major immediate-early promoter, *J Virol* 64 [7], Seite 3532-6.
- Hofmann, H.; Floss, S. und Stamminger, T. (2000): Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b, *J Virol* 74 [6], Seite 2510-24.
- Huang, C. H. und Chen, J. Y. (2002): Identification of additional IE2-p86-responsive cis-repressive sequences within the human cytomegalovirus major immediate early gene promoter, *J Biomed Sci* 9 [5], Seite 460-70.
- Huang, L. und Stinski, M. F. (1995): Binding of cellular repressor protein or the IE2 protein to a cis-acting negative regulatory element upstream of a human cytomegalovirus early promoter, *J Virol* 69 [12], Seite 7612-21.
- Huang, T. H.; Oka, T.; Asai, T.; Okada, T.; Merrills, B. W.; Gertson, P. N.; Whitson, R. H. und Itakura, K. (1996): Repression by a differentiation-specific factor of the human cytomegalovirus enhancer, *Nucleic Acids Res* 24 [9], Seite 1695-701.
- Hummel, M. und Abecassis, M. M. (2002): A model for reactivation of CMV from latency, *J Clin Virol* 25 [Suppl 2], Seite S123-36.
- Hummel, M.; Zhang, Z.; Yan, S.; DePlaen, I.; Golia, P.; Varghese, T.; Thomas, G. und Abecassis, M. I. (2001): Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency, *J Virol* 75 [10], Seite 4814-22.
- Ishov, A. M. und Maul, G. G. (1996): The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition, *J Cell Biol* 134 [4], Seite 815-26.
- Ishov, A. M.; Stenberg, R. M. und Maul, G. G. (1997): Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment, *J Cell Biol* 138 [1], Seite 5-16.
- Iskenderian, A. C.; Huang, L.; Reilly, A.; Stenberg, R. M. und Anders, D. G. (1996): Four of eleven loci required for transient complementation of human cytomegalovirus DNA replication cooperate to activate expression of replication genes, *J Virol* 70 [1], Seite 383-92.

- Isom, H. C. (1979): Stimulation of ornithine decarboxylase by human cytomegalovirus, *J Gen Virol* 42 [2], Seite 265-78.
- Jault, F. M.; Jault, J. M.; Ruchti, F.; Fortunato, E. A.; Clark, C.; Corbeil, J.; Richman, D. D. und Spector, D. H. (1995): Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest, *J Virol* 69 [11], Seite 6697-704.
- Jenkins, D. E.; Martens, C. L. und Mocarski, E. S. (1994): Human cytomegalovirus late protein encoded by ie2: a trans-activator as well as a repressor of gene expression, *J Gen Virol* 75 [Pt 9], Seite 2337-48.
- Jupp, R.; Hoffmann, S.; Depto, A.; Stenberg, R. M.; Ghazal, P. und Nelson, J. A. (1993): Direct interaction of the human cytomegalovirus IE86 protein with the cis repression signal does not preclude TBP from binding to the TATA box, *J Virol* 67 [9], Seite 5595-604.
- Jupp, R.; Hoffmann, S.; Stenberg, R. M.; Nelson, J. A. und Ghazal, P. (1993): Human cytomegalovirus IE86 protein interacts with promoter-bound TATA-binding protein via a specific region distinct from the autorepression domain, *J Virol* 67 [12], Seite 7539-46.
- Kerry, J. A.; Priddy, M. A. und Stenberg, R. M. (1994): Identification of sequence elements in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene promoter required for activation by viral gene products, *J Virol* 68 [7], Seite 4167-76.
- Klucher, K. M.; Sommer, M.; Kadonaga, J. T. und Spector, D. H. (1993): In vivo and in vitro analysis of transcriptional activation mediated by the human cytomegalovirus major immediate-early proteins, *Mol Cell Biol* 13 [2], Seite 1238-50.
- Kondo, K. und Mocarski, E. S. (1995): Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors, *Scand J Infect Dis Suppl* 99, Seite 63-7.
- Kondo, K.; Xu, J. und Mocarski, E. S. (1996): Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [20], Seite 11137-42.
- Kronschnabl, M.; Marschall, M. und Stamminger, T. (2002): Efficient and tightly regulated expression systems for the human cytomegalovirus major transactivator protein IE2p86 in permissive cells, *Virus Res* 83 [1-2], Seite 89-102.
- Krosky, P. M.; Underwood, M. R.; Turk, S. R.; Feng, K. W.; Jain, R. K.; Ptak, R. G.; Westerman, A. C.; Biron, K. K.; Townsend, L. B. und Drach, J. C. (1998): Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56, *J Virol* 72 [6], Seite 4721-8.
- Lang, D.; Gebert, S.; Arlt, H. und Stamminger, T. (1995): Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB, *J Virol* 69 [10], Seite 6030-7.

- Lang, D. und Stamminger, T. (1993): The 86-kilodalton IE-2 protein of human cytomegalovirus is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts directly with the negative autoregulatory response element located near the cap site of the IE-1/2 enhancer-promoter, *J Virol* 67 [1], Seite 323-31.
- Lang, D. und Stamminger, T. (1994): Minor groove contacts are essential for an interaction of the human cytomegalovirus IE2 protein with its DNA target, *Nucleic Acids Res* 22 [16], Seite 3331-8.
- Lashmit, P. E.; Stinski, M. F.; Murphy, E. A. und Bullock, G. C. (1998): A cis repression sequence adjacent to the transcription start site of the human cytomegalovirus US3 gene is required to down regulate gene expression at early and late times after infection, *J Virol* 72 [12], Seite 9575-84.
- Latchman, D.S. (1993): *Transcription Factors A Practical Approach*, Rickwood, D. , Hames, B.D., *The Practical Approach Series*, IRL Press, Oxford.
- Lee, G.; Wu, J.; Luu, P.; Ghazal, P. und Flores, O. (1996): Inhibition of the association of RNA polymerase II with the preinitiation complex by a viral transcriptional repressor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [6], Seite 2570-5.
- Lee, J. M.; Kang, H. J.; Lee, H. R.; Choi, C. Y.; Jang, W. J. und Ahn, J. H. (2003): PIAS1 enhances SUMO-1 modification and the transactivation activity of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus, *FEBS Lett* 555 [2], Seite 322-8.
- Lembo, D.; Gribaudo, G.; Cavallo, R.; Riera, L.; Angeretti, A.; Hertel, L. und Landolfo, S. (1999): Human cytomegalovirus stimulates cellular dihydrofolate reductase activity in quiescent cells, *Intervirology* 42 [1], Seite 30-6.
- Lembo, D.; Gribaudo, G.; Riera, L.; Mondo, A.; Cavallo, R.; Angeretti, A. und Landolfo, S. (2000): The thymidylate synthase inhibitor ZD1694 potently inhibits murine and human cytomegalovirus replication in quiescent fibroblasts, *Antiviral Res* 47 [2], Seite 111-20.
- Liebermann, P.M., Berk, A.J. (1991): The Zta trans-activator protein stabilizes TFIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction., *Genes and Development* 5, Seite 2441-2454.
- Liu, B.; Hermiston, T. W. und Stinski, M. F. (1991): A cis-acting element in the major immediate-early (IE) promoter of human cytomegalovirus is required for negative regulation by IE2, *J Virol* 65 [2], Seite 897-903.
- Liu, B. und Stinski, M. F. (1992): Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements, *J Virol* 66 [7], Seite 4434-44.
- Liu, R.; Baillie, J.; Sissons, J. G. und Sinclair, J. H. (1994): The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells, *Nucleic Acids Res* 22 [13], Seite 2453-9.

- Loidl, P. (1994): Histone acetylation: facts and questions, *Chromosoma* 103 [7], Seite 441-9.
- Lu, M. und Shenk, T. (1996): Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S, *J Virol* 70 [12], Seite 8850-7.
- Lu, M. und Shenk, T. (1999): Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle, *J Virol* 73 [1], Seite 676-83.
- Lubon, H.; Ghazal, P.; Hennighausen, L.; Reynolds-Kohler, C.; Lockshin, C. und Nelson, J. (1989): Cell-specific activity of the modulator region in the human cytomegalovirus major immediate-early gene, *Mol Cell Biol* 9 [3], Seite 1342-5.
- Lukac, D. M.; Harel, N. Y.; Tanese, N. und Alwine, J. C. (1997): TAF-like functions of human cytomegalovirus immediate-early proteins, *J Virol* 71 [10], Seite 7227-39.
- Lukac, D. M.; Manuppello, J. R. und Alwine, J. C. (1994): Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex, *J Virol* 68 [8], Seite 5184-93.
- Macias, M. P.; Huang, L.; Lashmit, P. E. und Stinski, M. F. (1996): Cellular or viral protein binding to a cytomegalovirus promoter transcription initiation site: effects on transcription, *J Virol* 70 [6], Seite 3628-35.
- Macias, M. P. und Stinski, M. F. (1993): An in vitro system for human cytomegalovirus immediate early 2 protein (IE2)-mediated site-dependent repression of transcription and direct binding of IE2 to the major immediate early promoter, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [2], Seite 707-11.
- Malone, C. L.; Vesole, D. H. und Stinski, M. F. (1990): Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins, *J Virol* 64 [4], Seite 1498-506.
- Marchini, A.; Liu, H. und Zhu, H. (2001): Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes, *J Virol* 75 [4], Seite 1870-8.
- Martinez-Balbas, M. A.; Bannister, A. J.; Martin, K.; Haus-Seuffert, P.; Meisterernst, M. und Kouzarides, T. (1998): The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription, *Embo J* 17 [10], Seite 2886-93.
- Masse, M. J.; Karlin, S.; Schachtel, G. A. und Mocarski, E. S. (1992): Human cytomegalovirus origin of DNA replication (oriLyt) resides within a highly complex repetitive region, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [12], Seite 5246-50.
- McGavran, M. H. und Smith, M. G. (1965): Ultrastructural, Cytochemical, and Microchemical Observations on Cytomegalovirus (Salivary Gland Virus) Infection of Human Cells in Tissue Culture, *Exp Mol Pathol* 76, Seite 1-10.

- McVoy, M. A.; Nixon, D. E. und Adler, S. P. (1997): Circularization and cleavage of guinea pig cytomegalovirus genomes, *J Virol* 71 [6], Seite 4209-17.
- Meier, J. L. und Pruessner, J. A. (2000): The human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer region is required for efficient viral replication and immediate-early gene expression, *J Virol* 74 [4], Seite 1602-13.
- Meier, J. L. und Stinski, M. F. (1996): Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression, *Intervirology* 39 [5-6], Seite 331-42.
- Meier, J. L. und Stinski, M. F. (1997): Effect of a modulator deletion on transcription of the human cytomegalovirus major immediate-early genes in infected undifferentiated and differentiated cells, *J Virol* 71 [2], Seite 1246-55.
- Mendelson, M.; Monard, S.; Sissons, P. und Sinclair, J. (1996): Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors, *J Gen Virol* 77 [Pt 12], Seite 3099-102.
- Mocarski, E. S. (1993): Cytomegalovirus biology and replication, Roizman, B.; Whitley R. Lopez E., *The Human Herpesviruses* Seite 173-226, Raven Press, New York.
- Mocarski, E. S., Courcelle, C.T. (2001): Cytomegaloviruses and Their Replication, Knipe, D. , Howley, P., Griffin, D., Lamb, R. Martin, M., Straus, S., Fields Virology Seite 2629 - 2673, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mocarski, E. S.; Kemble, G. W.; Lyle, J. M. und Greaves, R. F. (1996): A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [21], Seite 11321-6.
- Murphy, E. A.; Streblow, D. N.; Nelson, J. A. und Stinski, M. F. (2000): The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells, *J Virol* 74 [15], Seite 7108-18.
- Murphy, E.; Rigoutsos, I.; Shibuya, T. und Shenk, T. E. (2003): Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [23], Seite 13585-90. Epub 2003 Oct 30.
- Murphy, E.; Yu, D.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Dickson, M.; Jarvis, M. A.; Hahn, G.; Nelson, J. A.; Myers, R. M. und Shenk, T. E. (2003): Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [25], Seite 14976-81. Epub 2003 Dec 1.
- Murphy, J. C.; Fischle, W.; Verdin, E. und Sinclair, J. H. (2002): Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation, *Embo J* 21 [5], Seite 1112-20.
- Nelson, J. A.; Gnann, J. W., Jr. und Ghazal, P. (1990): Regulation and tissue-specific expression of human cytomegalovirus, *Curr Top Microbiol Immunol* 154, Seite 75-100.

- Nelson, J. A. und Groudine, M. (1986): Transcriptional regulation of the human cytomegalovirus major immediate-early gene is associated with induction of DNase I-hypersensitive sites, *Mol Cell Biol* 6 [2], Seite 452-61.
- Nelson, J. A.; Reynolds-Kohler, C. und Smith, B. A. (1987): Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene, *Mol Cell Biol* 7 [11], Seite 4125-9.
- Niller, H. H. und Hennighausen, L. (1990): Phytohemagglutinin-induced activity of cyclic AMP (cAMP) response elements from cytomegalovirus is reduced by cyclosporine and synergistically enhanced by cAMP, *J Virol* 64 [5], Seite 2388-91.
- Niller, H. H. und Hennighausen, L. (1991): Formation of several specific nucleoprotein complexes on the human cytomegalovirus immediate early enhancer, *Nucleic Acids Res* 19 [13], Seite 3715-21.
- Noris, E.; Zannetti, C.; Demurtas, A.; Sinclair, J.; De Andrea, M.; Gariglio, M. und Landolfo, S. (2002): Cell cycle arrest by human cytomegalovirus 86-kDa IE2 protein resembles premature senescence, *J Virol* 76 [23], Seite 12135-48.
- Ogryzko, V. V.; Schiltz, R. L.; Russanova, V.; Howard, B. H. und Nakatani, Y. (1996): The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell* 87 [5], Seite 953-9.
- Pari, G. S. und Anders, D. G. (1993): Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication, *J Virol* 67 [12], Seite 6979-88.
- Pari, G. S.; Kacica, M. A. und Anders, D. G. (1993): Open reading frames UL44, IRS1/TRS1, and UL36-38 are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA synthesis, *J Virol* 67 [5], Seite 2575-82.
- Pass, R. F. (2001): Cytomegalovirus, Knipe, D. , Howley, P., *Fields Virology* 2, 4. Auflage, Seite 2675-2705, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Pass, R. F.; Boppana S. (1999): Cytomegalovirus, Jeffries, D.J.; Hudson C.N., *Viral Infections in Obstetrics and Gynaecology*, Arnold, New York.
- Pazin, M. J. und Kadonaga, J. T. (1997): What's up and down with histone deacetylation and transcription?, *Cell* 89 [3], Seite 325-8.
- Penfold, M. E. und Mocarski, E. S. (1997): Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis, *Virology* 239 [1], Seite 46-61.
- Pizzorno, M. C. und Hayward, G. S. (1990): The IE2 gene products of human cytomegalovirus specifically down-regulate expression from the major immediate-early promoter through a target sequence located near the cap site, *J Virol* 64 [12], Seite 6154-65.

- Pizzorno, M. C.; Mullen, M. A.; Chang, Y. N. und Hayward, G. S. (1991): The functionally active IE2 immediate-early regulatory protein of human cytomegalovirus is an 80-kilodalton polypeptide that contains two distinct activator domains and a duplicated nuclear localization signal, *J Virol* 65 [7], Seite 3839-52.
- Pizzorno, M. C.; O'Hare, P.; Sha, L.; LaFemina, R. L. und Hayward, G. S. (1988): trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus, *J Virol* 62 [4], Seite 1167-79.
- Prosch, S.; Wuttke, R.; Kruger, D. H. und Volk, H. D. (2002): NF-kappaB--a potential therapeutic target for inhibition of human cytomegalovirus (re)activation?, *Biol Chem* 383 [10], Seite 1601-9.
- Reid, G. G.; Ellsmore, V. und Stow, N. D. (2003): An analysis of the requirements for human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA synthesis in the presence of the herpes simplex virus type 1 replication fork proteins, *Virology* 308 [2], Seite 303-16.
- Robidoux, S.; Guerin, S. L.; Eskild, W.; Kroepelin, C. F. und Hansson, V. (1992): Salt-dependent formation of DNA/protein complexes in vitro, as viewed by the gel mobility shift assay, *Biotechniques* 13 [3], Seite 354-7.
- Rodems, S. M.; Clark, C. L. und Spector, D. H. (1998): Separate DNA elements containing ATF/CREB and IE86 binding sites differentially regulate the human cytomegalovirus UL112-113 promoter at early and late times in the infection, *J Virol* 72 [4], Seite 2697-707.
- Roizman, B. (1993): The Family Herpesviridae, Whitly, R.J. & c. Lopez, The Human Herpesviruses Seite 1-9, Raven Press, New York.
- Salvant, B. S.; Fortunato, E. A. und Spector, D. H. (1998): Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription, *J Virol* 72 [5], Seite 3729-41.
- Sambrock, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, V.; Clark, C. L.; Yen, J. Y.; Dwarakanath, R. und Spector, D. H. (2002): Viable human cytomegalovirus recombinant virus with an internal deletion of the IE2 86 gene affects late stages of viral replication, *J Virol* 76 [6], Seite 2973-89.
- Sarisky, R. T. und Hayward, G. S. (1996): Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays, *J Virol* 70 [11], Seite 7398-413.
- Schwartz, R.; Helmich, B. und Spector, D. H. (1996): CREB and CREB-binding proteins play an important role in the IE2 86-kilodalton protein-mediated transactivation of the human cytomegalovirus 2.2-kilobase RNA promoter, *J Virol* 70 [10], Seite 6955-66.

- Schwartz, R.; Sommer, M. H.; Scully, A. und Spector, D. H. (1994): Site-specific binding of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein to an early gene promoter, *J Virol* 68 [9], Seite 5613-22.
- Scully, A. L.; Sommer, M. H.; Schwartz, R. und Spector, D. H. (1995): The human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein interacts with an early gene promoter via site-specific DNA binding and protein-protein associations, *J Virol* 69 [10], Seite 6533-40.
- Shelbourn, S. L.; Kothari, S. K.; Sissons, J. G. und Sinclair, J. H. (1989): Repression of human cytomegalovirus gene expression associated with a novel immediate early regulatory region binding factor, *Nucleic Acids Res* 17 [22], Seite 9165-71.
- Shelbourn, S. L.; Sissons, J. G. und Sinclair, J. H. (1989): Expression of oncogenic ras in human teratocarcinoma cells induces partial differentiation and permissiveness for human cytomegalovirus infection, *J Gen Virol* 70 [Pt 2], Seite 367-74.
- Shirakata, M.; Terauchi, M.; Ablikim, M.; Imadome, K.; Hirai, K.; Aso, T. und Yamanashi, Y. (2002): Novel immediate-early protein IE19 of human cytomegalovirus activates the origin recognition complex I promoter in a cooperative manner with IE72, *J Virol* 76 [7], Seite 3158-67.
- Sinclair, J.; Baillie, J.; Bryant, L. und Caswell, R. (2000): Human cytomegalovirus mediates cell cycle progression through G(1) into early S phase in terminally differentiated cells, *J Gen Virol* 81 [Pt 6], Seite 1553-65.
- Sinclair, J. H.; Baillie, J.; Bryant, L. A.; Taylor-Wiedeman, J. A. und Sissons, J. G. (1992): Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line, *J Gen Virol* 73 [Pt 2], Seite 433-5.
- Sindre, H.; Tjønnfjord, G. E.; Rollag, H.; Ranneberg-Nilsen, T.; Veiby, O. P.; Beck, S.; Degre, M. und Hestdal, K. (1996): Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells, *Blood* 88 [12], Seite 4526-33.
- Slobedman, B. und Mocarski, E. S. (1999): Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus, *J Virol* 73 [6], Seite 4806-12.
- Smith, I. L.; Cherrington, J. M.; Jiles, R. E.; Fuller, M. D.; Freeman, W. R. und Spector, S. A. (1997): High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes, *J Infect Dis* 176 [1], Seite 69-77.
- Soderberg-Naucler, C.; Fish, K. N. und Nelson, J. A. (1997): Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors, *Cell* 91 [1], Seite 119-26.
- Soderberg-Naucler, C. und Nelson, J. Y. (1999): Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system, *Intervirology* 42 [5-6], Seite 314-21.

- Sommer, M. H.; Scully, A. L. und Spector, D. H. (1994): Transactivation by the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein requires a domain that binds to both the TATA box-binding protein and the retinoblastoma protein, *J Virol* 68 [10], Seite 6223-31.
- Song, Y. J. und Stinski, M. F. (2002): Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E2F-responsive genes: a DNA microarray analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [5], Seite 2836-41.
- Spaete, R. R.; Gehrz, R. C. und Landini, M. P. (1994): Human cytomegalovirus structural proteins, *J Gen Virol* 75 [Pt 12], Seite 3287-308.
- Spector, D. H. (1996): Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes, *Intervirology* 39 [5-6], Seite 361-77.
- Spector, D. J. und Tevethia, M. J. (1994): Protein-protein interactions between human cytomegalovirus IE2-580aa and pUL84 in lytically infected cells, *J Virol* 68 [11], Seite 7549-53.
- Speir, E.; Modali, R.; Huang, E. S.; Leon, M. B.; Shawl, F.; Finkel, T. und Epstein, S. E. (1994): Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis, *Science* 265 [5170], Seite 391-4.
- Stagno, S.; Pass, R. F.; Dworsky, M. E. und Alford, C. A., Jr. (1982): Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission, *Clin Obstet Gynecol* 25 [3], Seite 563-76.
- Stenberg, R. M. (1996): The human cytomegalovirus major immediate-early gene, *Intervirology* 39 [5-6], Seite 343-9.
- Stenberg, R. M.; Fortney, J.; Barlow, S. W.; Magrane, B. P.; Nelson, J. A. und Ghazal, P. (1990): Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains, *J Virol* 64 [4], Seite 1556-65.
- Stenberg, R. M.; Thomsen, D. R. und Stinski, M. F. (1984): Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus, *J Virol* 49 [1], Seite 190-9.
- Stinski, M. F. (1978): Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides, *J Virol* 26 [3], Seite 686-701.
- Stinski, M. F.; Thomsen, D. R.; Stenberg, R. M. und Goldstein, L. C. (1983): Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus, *J Virol* 46 [1], Seite 1-14.
- Taylor-Wiedeman, J.; Sissons, J. G.; Borysiewicz, L. K. und Sinclair, J. H. (1991): Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells, *J Gen Virol* 72 [Pt 9], Seite 2059-64.

- Thomsen, D. R.; Stenberg, R. M.; Goins, W. F. und Stinski, M. F. (1984): Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 [3], Seite 659-63.
- Truss, M. (1992): Untersuchung der Wechselwirkungen von Steroidhormon-Rezeptoren mit hormonregulierten Elementen, Dr. rer. nat., Fachbereich Biologie, Philipps Universität Marburg, Marburg.
- Tsai, H. L.; Kou, G. H.; Tang, F. M.; Wu, C. W. und Lin, Y. S. (1997): Negative regulation of a heterologous promoter by human cytomegalovirus immediate-early protein IE2, *Virology* 238 [2], Seite 372-9.
- Turner, B. M. (1991): Histone acetylation and control of gene expression, *J Cell Sci* 99 [Pt 1], Seite 13-20.
- van den Heuvel, S. und Harlow, E. (1993): Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control, *Science* 262 [5142], Seite 2050-4.
- Waheed, I.; Chiou, C. J.; Ahn, J. H. und Hayward, G. S. (1998): Binding of the human cytomegalovirus 80-kDa immediate-early protein (IE2) to minor groove A/T-rich sequences bounded by CG dinucleotides is regulated by protein oligomerization and phosphorylation, *Virology* 252 [1], Seite 235-57.
- Wara-aswapati, N.; Yang, Z.; Waterman, W. R.; Koyama, Y.; Tetradis, S.; Choy, B. K.; Webb, A. C. und Auron, P. E. (1999): Cytomegalovirus IE2 protein stimulates interleukin 1beta gene transcription via tethering to Spi-1/PU.1, *Mol Cell Biol* 19 [10], Seite 6803-14.
- Waterborg, J. H. und Matthews, H. R. (1994): The Lowry method for protein quantitation, *Methods Mol Biol* 32, Seite 1-4.
- White, E. A.; Clark, C. L.; Sanchez, V. und Spector, D. H. (2004): Small internal deletions in the human cytomegalovirus IE2 gene result in nonviable recombinant viruses with differential defects in viral gene expression, *J Virol* 78 [4], Seite 1817-30.
- Wiebusch, L. (2001): Entdeckung und Charakterisierung eines ungewöhnlichen Zellzyklusarrests hervorgerufen durch das IE2-Protein des humanen Zytomegalievirus (HCMV), Dr. rer. nat., Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Wiebusch, L.; Asmar, J.; Uecker, R. und Hagemeyer, C. (2003): Human cytomegalovirus immediate-early over protein 2 (IE2)-mediated activation of cyclin E is cell-cycle-independent and forces S-phase entry in IE2-arrested cells, *J Gen Virol* 84 [Pt 1], Seite 51-60.
- Wiebusch, L. und Hagemeyer, C. (1999): Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1), *J Virol* 73 [11], Seite 9274-83.
- Wiebusch, L. und Hagemeyer, C. (2001): The human cytomegalovirus immediate early 2 protein dissociates cellular DNA synthesis from cyclin-dependent kinase activation, *Embo J* 20 [5], Seite 1086-98.

-
- Wiebusch, L.; Uecker, R. und Hagemeyer, C. (2003): Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin, *EMBO Rep* 4 [1], Seite 42-6.
- Wright, D. A.; Staprans, S. I. und Spector, D. H. (1988): Four phosphoproteins with common amino termini are encoded by human cytomegalovirus AD169, *J Virol* 62 [1], Seite 331-40.
- Wright, H. T., Jr.; Goodheart, C. R. und Lielausis, A. (1964): Human Cytomegalovirus. Morphology by Negative Staining, *Virology* 23, Seite 419-24.
- Wu, J.; Jupp, R.; Stenberg, R. M.; Nelson, J. A. und Ghazal, P. (1993): Site-specific inhibition of RNA polymerase II preinitiation complex assembly by human cytomegalovirus IE86 protein, *J Virol* 67 [12], Seite 7547-55.
- Xu, Y.; Colletti, K. S. und Pari, G. S. (2002): Human cytomegalovirus UL84 localizes to the cell nucleus via a nuclear localization signal and is a component of viral replication compartments, *J Virol* 76 [17], Seite 8931-8.
- Yeung, K. C.; Stoltzfus, C. M. und Stinski, M. F. (1993): Mutations of the human cytomegalovirus immediate-early 2 protein defines regions and amino acid motifs important in transactivation of transcription from the HIV-1 LTR promoter, *Virology* 195 [2], Seite 786-92.
- Yoo, Y. D.; Chiou, C. J.; Choi, K. S.; Yi, Y.; Michelson, S.; Kim, S.; Hayward, G. S. und Kim, S. J. (1996): The IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus induces expression of the human transforming growth factor beta1 gene through an Egr-1 binding site, *J Virol* 70 [10], Seite 7062-70.
- Zhang, X. Y.; Asiedu, C. K.; Supakar, P. C. und Ehrlich, M. (1992): Increasing the activity of affinity-purified DNA-binding proteins by adding high concentrations of nonspecific proteins, *Anal Biochem* 201 [2], Seite 366-74.
- Zhu, H.; Shen, Y. und Shenk, T. (1995): Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis, *J Virol* 69 [12], Seite 7960-70.

VII. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des humanen Zytomegalievirus	4
Abb. 2: Lokalisation und Aufbau der MIE Genregion	11
Abb. 3: Regulatorische Domänen des HCMV IE2-Proteins	21
Abb. 4: Aktivitäten des HCMV IE2 Proteins	46
Abb. 5: Einfluss C-terminaler Sequenzen auf die Zellzyklusarrest-Aktivität des IE2 Proteins.	49
Abb. 6: Überlappung regulatorischer Domänen im C-Terminus des IE2-Proteins: Zellzyklusarrest, Transaktivierung und Autorepression.	52
Abb. 7: Einfluss N-terminaler Sequenzen auf den Zellzyklusarrest, die Transaktivierung sowie die Autorepression.	55
Abb. 8: Transaktivierung des UL112/113-Promotors und des c-fos-Promotors durch das wt IE2-Protein und die Mutanten.	58
Abb. 9: Repression des MIE-Promotors durch interne Deletionsmutanten.	59
Abb. 10: Etablierung eines DNA-Bindungsassays für das IE2-Protein.	63
Abb. 11: IE2 aus Extrakten transfizierter Zellen bindet an eine crs enthaltende Zielsequenz.	65
Abb. 12: Einfluss der Menge an poly (dA-dT)-(dA-dT)-Kompetitor-DNA auf die Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins.	66
Abb. 13: Einfluss verschiedener Kompetitor DNAs auf die Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins.	67
Abb. 14: Titration der Menge des eingesetzten Zellextraktes.	68
Abb. 15: Bindung des IE2-Proteins an die crs	69
Abb. 16: Nachweis der Spezifität der IE2-DNA-Interaktion über Konkurrenz mit nicht-markierter DNA	71
Abb. 17: Spezifische DNA-Bindung des IE2-Protein aus Extrakten transfizierter U373-Zellen.	72
Abb. 18: Nachweis der IE2-DNA-Interaktion während der viralen Infektion.	74
Abb. 19: IE2-vermittelte Repression des MIE Promotors in HeLa-Zellen.	76
Abb. 20: C-terminale Mutationen zerstören die DNA-Bindungsfähigkeit des IE2-Proteins.	77
Abb. 21: DNA-Bindung der internen Deletionsmutanten.	79

Abb. 22: Die putative Zinkfingerdomäne wird für die DNA-Bindung nicht benötigt.	81
Abb. 23: Funktionelle Domänen im HCMV IE2-Protein.	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovin serum albumin</i>)
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CBP	CREB-bindendes Protein
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
CDV	Cidofovir
GCV	Ganciclovir
CRE	cAMP responsives Element (<i>cyclic AMP response element</i>)
CREB	CRE-bindendes Protein (<i>CRE-binding protein</i>)
crs	<i>cis-repression sequence</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzymimmunttest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
et al.	<i>et alii</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FKS	fötales Kälberserum
FOS	Foscarnet
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCMV	humanes Zytomegalievirus (<i>human cytomegalovirus</i>)
IE	<i>immediate early</i>
IE2	<i>Immediate Early-Protein 2</i>

IE1	<i>Immediate Early</i> -Protein 1
IFN	Interferon
kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MIE	<i>major immediate early</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NKS	Neugeborenen Kälberserum
NLS	Signalsequenz für die nukleare Lokalisation (<i>nuclear localization signal</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PML	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
POD	<i>PML oncogenic domain</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
pZF	putative Zinkfingerdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP-1	Transkriptionsfaktor Spezifitätsprotein 1
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylaminomethan
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

Für Maßeinheiten wurde in der Regel das SI-System verwendet. Gebräuchliche englische Bezeichnungen sind in kursiver Schreibweise angegeben.

Veröffentlichungen

Posterpräsentationen und Vorträge

Asmar J., Matthes E., Hallatschek W. and Schumann, R.R., Modulation of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) gene expression by a triplex-forming oligonucleotide. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Berlin, 1998, Posterpräsentation

Asmar J. and Hagemeier C., HCMV IE2: limiting sequence requirements for transactivation, autoregulation, and cell cycle regulation. 9th International Cytomegalovirus Workshop and 1st International Betaherpesvirus Workshop, Maastricht, May 2003, Vortrag und Posterpräsentation

Publikationen

Wiebusch L., Asmar J., Uecker R. and Hagemeier, C., Human cytomegalovirus immediate-early protein 2 (IE2)-mediated activation of cyclin E is cell-cycle-independent and forces S-phase entry in IE2-arrested cells. *Journal of Gen. Virology* (2003), 84: 51-60

Asmar J., Wiebusch L., Truss M. and Hagemeier C., The putative zinc-finger of the Human Cytomegalovirus IE2 86-kDa protein is dispensable for DNA binding and autorepression thereby demarcating a concise core domain in the C-terminus of IE2. *Journal of Virology*, *in press*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Doktorarbeit von mir selbstständig verfasst wurde und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Jasmin Asmar

Berlin, 19. Juli 2004

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christian Hagemeyer gilt mein Dank für die interessante Themenstellung zu dieser Arbeit, die fachliche Betreuung sowie seiner steten Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Detlev Krüger danke ich für die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Biologie und für ihre Begutachtung.

Herrn PD Dr. Martin Messerle gilt gleichfalls mein Dank für die Begutachtung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Truss für seine Unterstützung und fachliche Beratung bei der Etablierung des IE2-DNA-Bindungsassays.

Ich danke Frau PD Dr. Susanna Prösch und Regine Wuttke für die zur Verfügung gestellten MIE-Reporterkonstrukte und Herrn Prof. Dr. Mark Stinski für die Konstrukte der IE2-Zinkfingermutante.

Vielen Dank allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern im Labor, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei es durch praktische Hilfe, anregende Diskussionen, gute Beratung, Krisenhilfe und Computernotdienst oder unterhaltsame Mensa-Gänge.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meinen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.